

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ROBERT KOCH

1843-1910

La mort de Robert Koch, de celui qui a découvert la spore charbonneuse, le bacille de la tuberculose, le vibrion cholérique et créé une bonne partie des méthodes bactériologiques, a soulevé une émotion universelle.

Les disciples de Pasteur tiennent à saluer ici même, dans ces *Annales* consacrées à la microbiologie, la mémoire de ce grand homme, à dire leur admiration pour son œuvre et les regrets que leur cause sa perte.

Koch est un des fondateurs de la bactériologie; il n'a eu qu'un prédécesseur, Pasteur.

En 1876 il marquait son entrée dans la science nouvelle en décrivant la spore du charbon et les conditions de sa formation, il apportait ainsi l'élément indispensable à la connaissance de l'étiologie de la maladie charbonneuse. Puis, il imagine les cultures sur milieux solides qui ont donné de si fructueuses moissons. C'est en 1882 que paraît la note à jamais célèbre sur le bacille de la tuberculose; il suffisait de la lire pour être enthousiasmé, dans la précision et dans la simplicité du langage on sentait l'exactitude de la grande découverte. Deux ans plus tard, à la suite d'une campagne en Egypte et dans l'Inde, l'isolement d'un vibrion spécifique de l'intestin des cholériques affirme la puissance des méthodes inventées par Koch.

Ces beaux travaux ont été réalisés en huit ans et par des moyens à la portée de tous. Ils ont valu à Koch la célébrité et une immense autorité. Il semblait que rien ne fût impossible à ce parfait technicien, à ce chercheur sagace. Aussi,

lorsqu'en 1890 il annonce la préparation d'une substance capable de prévenir et de guérir la tuberculose, nul ne doute. La tuberculine ne guérit pas encore la tuberculose, sa découverte est cependant une des plus intéressantes qui aient été faites. La déconvenue de ceux qui voyaient déjà le fléau vaincu les a rendus injustes, ils négligent tout ce que Koch a apporté de neuf avec sa lymphe, à savoir un procédé de diagnostic d'une incomparable sûreté applicable à d'autres maladies infectieuses, et le premier exemple de ces phénomènes de sensibilisation de l'organisme dont l'étude passionne aujourd'hui les biologistes.

Ce faisceau radieux de découvertes ne comprend pas l'œuvre entière de Koch, il faut y joindre nombre de travaux sur l'infection des plaies, sur la désinfection, la dysenterie, l'ophtalmie d'Egypte, et sur les différences entre la tuberculose humaine et la tuberculose bovine. Ils suffiraient à établir la réputation d'un savant ordinaire.

Koch donnait l'impression de la force physique et de l'énergie morale; les années n'avaient diminué ni sa vigueur ni son entrain, à soixante ans il parcourait l'Inde et l'Afrique à la recherche des maladies tropicales. Il a rapporté de ces voyages des contributions importantes à l'étude de la peste bubonique, du paludisme, de la maladie du sommeil et aussi des piroplasmoses et de la peste bovine.

En Robert Koch il faut admirer non seulement le grand inventeur mais le grand maître, le chef d'école. Les bactériologistes de tous les pays sont ses élèves, puisqu'ils se servent des méthodes trouvées par lui et que leurs investigations ont souvent ses travaux comme point de départ. Les jeunes savants venus de toutes les parties du monde se rencontraient dans les laboratoires de l'office sanitaire, puis dans ceux de l'Institut pour l'étude des maladies infectieuses. Koch savait leur communiquer sa passion de la science et distinguer parmi eux les véritables talents. La magnifique floraison de la bactériologie allemande est surtout son œuvre. Le nom de Koch évoque ceux de ses disciples directs, réputés pour leurs travaux : Gaffky, Loeffler, Behring, Pfeiffer, Hueppe, Wassermann, Kitasato, etc. C'est à eux et à la famille de l'illustre disparu que nous adressons nos condoléances et l'expression de notre profonde sympathie.

LA RÉDACTION.

TECHNIQUE FROMAGÈRE

Théorie et Pratique

PAR P. MAZÉ,

(Suite)

V. — « MALADIES » DES FROMAGES.

Les maladies des fromages peuvent être groupées en deux catégories ; celles qui résultent d'une fabrication défectueuse, capable de détruire l'harmonie qui doit toujours régner dans les associations des ferments utiles, et celles qui sont produites par l'intervention de ferments de maladie.

Les accidents du premier groupe sont causés :

1° Par un développement exagéré d'une espèce déterminée, en *camemberti* ;

2° Par un développement exagéré d'une espèce déterminée, en particulier de la moisissure ;

3° Par une végétation trop luxuriante de toutes les espèces de champignons.

Le développement précoce des mycodermes et de l'oïdium est dû à un ensemencement trop abondant de ces espèces, effectué directement par du lait altéré ou contaminé, ou indirectement par les ustensiles malpropres de la fromagerie. Quand cet accident se produit, le caillé se recouvre déjà dans les moules d'une membrane visible ou tout au moins perceptible au toucher. Il affecte de préférence la face qui est exposée à l'air pendant l'égouttage ; ces microbes sont en effet aérobies et ne peuvent pas se multiplier sur la face qui est en contact avec le cajet.

La face supérieure, qui est généralement recouverte de sérum, réunit au contraire toutes les conditions les plus favorables à leur développement. Cet accident est surtout fréquent par les temps chauds et il s'observe aussi bien chez les fermiers que chez les industriels. Les premiers le provoquent par l'emploi de levains très impurs ; ils pourraient donc l'éviter facilement en apportant plus de soins à la traite, en conservant le lait destiné à la préparation des levains, dans des récipients propres et enfin en le plaçant dans des endroits

(1) Voir le numéro 5 de ces *Annales*.

peu favorables à la contamination, en couvrant les récipients, sans chercher toutefois à les fermer hermétiquement.

Les industriels sont plus exposés, toujours en raison du nombre élevé de leurs fournisseurs.

Un mauvais égouttage, provoqué par le manque d'acidité du lait, expose également les fromages à cet accident. C'est surtout pendant l'hiver que les industriels redoutent cet inconvénient. Le caillé qui s'égoutte lentement séjourne longtemps dans la salle d'égouttage ; comme la température y est toujours élevée, la pullulation des mycodermes et de l'oidium y est extrêmement rapide.

La nécessité d'élever la température jusqu'à 25° (voir. p. 415) vient encore aggraver le mal. La peau grasseuse se forme alors en quelques heures ; comme elle ne constitue pas une membrane filtrante, elle s'oppose énergiquement à l'égouttage, de sorte que le fromager se trouve acculé à une impasse dont il lui est impossible de sortir.

Les caillés qui sont ainsi envahis par les mycodermes et l'oidium pendant l'égouttage, ne se recouvrent pas de moisissure ; les spores du *Penicillium* qui ne se déposent généralement sur le caillé que dans le séchoir, trouvent le terrain entièrement envahi et elles ne peuvent plus germer. Par contre, la peau grasseuse s'épaissit beaucoup et dans cette membrane vivante, humide et gluante, les ferments anaérobies qui sont de véritables putréfiants se développent avec une grande facilité. Ils produisent beaucoup d'ammoniaque, sécrètent de la caséase, toutes conditions favorables à une liquéfaction rapide qui prend quelquefois les proportions d'une véritable catastrophe, en raison de la grande quantité de sérum que retient le caillé. C'est ainsi que l'on voit les fromages se résoudre entièrement en un liquide filant qui forme des stalactiques du haut en bas des étagères, tout en dégageant une odeur fétide.

Les fromagers préviennent ces accidents par des salages exagérés, le sel rétracte le caillé et expulse le liquide retenu en excès ; il agit en même temps comme antiseptique vis-à-vis des oidium et des ferments de la putréfaction, mais non des mycodermes. Ce procédé vient trop tard et n'est qu'un expédient, sorte de remède *in extremis* ; les fromages salés à l'excès sont fortement dépréciés.

Le véritable remède consiste à utiliser des levains de ferments lactiques préparés méthodiquement de façon à permettre de régler les constantes de la fabrication ; à désinfecter les moules, les cagets et les planches à l'eau bouillante, et à nettoyer les tables de dressage tous les jours, en utilisant au besoin, le sel comme antiseptique ; on évite ainsi radicalement ces accidents, parce que les opérations de la coagulation et de l'égouttage, qui sont fondamentales, s'accomplissent avec une régularité parfaite.

Si, d'un autre côté, on introduit dans le lait au moment de la mise en présure, les spores de *Penicillium album*, la moisissure ne fait jamais défaut.

Les fromagers soigneux savent éviter la maladie que je viens de décrire ; mais ils ne parviennent pas toujours à obtenir les résultats qu'ils désirent ; ils se heurtent à des conséquences moins graves d'un égouttage insuffisant :

Un caillé trop humide est défectueux surtout par la grande quantité de sucre de lait qu'il retient. Les champignons prennent sur ce caillé un développement exagéré, bien qu'ils apparaissent dans les délais normaux. Si les fromages n'ont pas été fortement salés, c'est l'*oidium camemberti* et la moisissure qui présentent une végétation exubérante ; au lieu de former un plissé fin à la base de la moisissure, l'*oidium* produit des circonvolutions qui recouvrent le caillé d'une peau épaisse, creusée de sillons sinueux, exactement comme la surface du cerveau. L'*oidium camemberti* ne se développe pas indéfiniment en épaisseur car il cherche le contact de l'air, et si le sucre de lait abonde, il se développe surtout en surface ; comme celle-ci est limitée, il est obligé de se plisser. Lorsque ses replis sont épais, il se forme dans toute cette masse de cellules vivantes, des quantités trop grandes de caséase ; la caséine des régions superficielles se trouve ainsi complètement liquéfiée, de sorte que la peau se détache du noyau encore acide. Quand on coupe ces fromages, on peut sortir facilement le noyau solide de la peau qui le recouvre. On ne saurait trouver de meilleure preuve contre l'intervention de la caséase des ferments superficiels dans la maturation normale des fromages. Si l'on ne remédie pas à cet accident, la solubilisation du caillé s'effectue en quelques jours ; et quand on coupe les fromages affinés dans ces conditions, on constate qu'ils sont constitués comme une sorte de poche, pleine d'un liquide plus ou moins épais. La pâte visqueuse possède le plus souvent une saveur âcre, amère, désagréable, due à une peptonisation très avancée ; le *Penicillium* cultivé sur du lait écrémé donne, au bout de quelques jours, un liquide transparent qui possède la même saveur. Si la peau est constituée surtout par l'*oidium*, la saveur de la pâte est moins désagréable.

Les fromagers expérimentés prévoient ces accidents et généralement ils les préviennent en forçant la dose de sel ; l'*oidium* disparaît dans ces conditions et on n'observe plus le décollement de la peau ; mais cet accident est fréquemment remplacé par un autre qui est tout aussi grave.

Le sel n'empêche pas le développement exagéré de la moisissure ; nous verrons au contraire qu'il la favorise en supprimant son unique antagoniste : l'*oidium*. La moisissure trouve la place libre, de sorte qu'elle dispose de la presque totalité du sucre de lait que retient le caillé ; son développement n'est donc limité que par la quantité d'aliments ternaires dont elle dispose ; si elle est suffisante pour lui permettre de tisser un feutrage mycélien épais, avant que les ferments du rouge ne se multiplient, elle forme une peau si dense, que ces derniers ne peuvent plus prendre contact avec le caillé s'ils

viennent de l'extérieur, ou puiser dans l'air l'oxygène qui leur est nécessaire, s'ils sont emprisonnés sous la couche mycélienne.

La moisissure supprime ainsi toutes les espèces concurrentes ; le fromage s'affine quand même, et rapidement, dès que le sucre de lait et l'acide lactique sont détruits ; mais le *Penicillium*, qui a acquis un développement énorme, s'attaque alors à la caséine et aux matières grasses qu'il consomme avec autant de facilité que le sucre de lait et l'acide lactique, de sorte que le fromage se réduit de plus en plus ; voilà pourquoi les praticiens disent que la grosse peau mange le fromage.

Si on pratique des coupes dans les produits ainsi préparés, à intervalles convenablement espacés, on constate de bonne heure sous le mycélium, la présence d'une zone liquide ; mais la peau ne se décolle pas, parce que la moisissure, qui est pourvue d'une végétation aérienne relativement haute, se développe en épaisseur sans se plisser et par conséquent sans se détacher. Le noyau solide du centre se liquéfie rapidement, mais on constate qu'il subit en même temps une véritable combustion car il se réduit visiblement. Quand la liquéfaction est complète, les deux peaux se rejoignent bientôt, si le fromage n'est pas livré à la consommation. La pâte qui a été affinée dans ces conditions, possède, à un très haut degré, la saveur que j'ai attribuée à la prédominance du *Penicillium*.

Contre de tels accidents les fromagers ne disposent toujours que d'un seul remède : un salage énergique capable de paralyser l'essor de la moisissure. Un séchage violent peut cependant ralentir le développement du *Penicillium* en rendant plus pénible la diffusion de l'acide lactique et du sucre de lait dans le caillé.

J'ai dit quels sont les inconvénients de l'emploi exagéré du sel ; le séchage a aussi ses désavantages ; il rend la maturation difficile en entravant la destruction de l'acide lactique et du sucre de lait. Le changement de réaction se fait surtout par accumulation d'ammoniaque ; les fromages deviennent nécessairement « forts » et piquants.

Le véritable remède consiste ici encore non pas à guérir mais à prévenir et comme moyen préventif il n'y en a qu'un, je l'ai indiqué ; je n'insiste pas.

Ferments de maladie.

Les maladies causées par des ferments nuisibles sont tout aussi redoutables que les précédentes, et si elles en diffèrent comme origines elles s'en rapprochent parfois beaucoup comme caractères et comme conséquences.

Les ferments nuisibles peuvent être groupés en deux catégories distinctes :

1° Ceux qui se développent dans le caillé acide ;

2° Ceux qui apparaissent après le changement de réaction de la pâte.

Dans chacun de ces groupes on trouve des ferments capables de se multiplier à l'abri de l'air et des ferments aérobies.

Maladies du caillé acide.

Les ferments lactiques exercent vis-à-vis des microbes de la putréfaction une action antiseptique suffisante sinon pour les tuer, du moins pour arrêter leur développement ; malheureusement, il existe beaucoup d'autres espèces de bactéries qui offrent une plus grande résistance à l'acidité, qui peuvent par conséquent se développer à côté des ferments lactiques, qui recherchent même leur société, de sorte qu'ils deviennent avec eux les hôtes habituels des laiteries.

Nous trouvons parmi ces microbes tout un groupe de ferments particuliers, les ferments propioniques, dont les effets ne sont que trop connus des fromagers.

Puis viennent les ferments filants qu'on rencontre dans tous les liquides sucrés acides ; les fabricants de sucre, les brasseurs, les vigneron, les distillateurs, les cidriers, les limonadiers même, les connaissent aussi bien que les fromagers. Ils sont en effet très répandus dans l'eau et dans le sol, et comme ils sont très prolifiques, qu'ils ne redoutent pas l'acidité produite par les ferments lactiques, qu'ils sont même moins exigeants qu'eux sur la qualité de leurs aliments, ils s'implantent partout et jusque sur les murs humides de tous les locaux de la fromagerie.

Les ferments propioniques se reconnaissent surtout par le dégagement de gaz qui résulte des fermentations qu'ils produisent. La formation d'acide propionique et d'alcool propylique aux dépens du sucre de lait entraîne toujours un dégagement d'hydrogène et d'acide carbonique. Ce dernier est soluble et se dégage par diffusion ; il ne se forme jamais en quantité suffisante pour produire des trous ou provoquer de la boursouffure. Mais l'hydrogène, gaz à peu près insoluble dans l'eau, se dégage en liberté dans le caillé et se taille une place en y faisant un trou. Aucune force mécanique ne peut s'opposer à ce dégagement et atténuer ses effets désastreux.

L'espèce la plus répandue de ces ferments est le *b. lactis aerogenes*, à peu près identique à celle qui est connue dans un autre ordre d'idées scientifiques sous le nom de bacille de Friedlander.

Le *b. l. aerogenes*, espèce très active, se développe en même temps que les ferments lactiques et ne leur cède en rien au point de vue de la rapidité du développement. S'il est abondant dans le lait, sa présence se révèle par le dégagement de bulles de gaz qui forment une mousse grossière, différente de celle que produit l'acide carbonique dans la fermentation alcoolique. S'il existe dans le lait utilisé en fromagerie, le caillé se gonfle dans les moules, et prend quelquefois l'aspect de véritables éponges. Le résultat varie avec l'acidité initiale du lait et le nombre de ferments présents.

Moins le lait est acide pour une même quantité de ferments, plus le dégagement de gaz est abondant ; il est rare qu'on n'observe pas de caillés parsemés de trous, et s'ils n'atteignent pas toujours des proportions inquiétantes, c'est parce que cette fermentation s'arrête aussi dans un milieu qui renferme 1 % d'acide lactique.

L'accident de la boursouffure s'observe aussi bien dans les fromages à pâte pressée ou cuite. J'ai toujours eu l'impression que ces ferments sont plus répandus dans le lait des vaches flamandes ou hollandaises, que dans celui des autres races laitières, mais je n'ai pas eu l'occasion de vérifier cette hypothèse ; la fréquence de la boursouffure dans les fromages de Hollande semble bien l'indiquer. Ce sont d'ailleurs les praticiens hollandais qui ont trouvé le remède à cette maladie ; pour éviter la boursouffure, surtout en été, ils additionnent le lait d'une faible quantité de nitrate de potassium (salpêtre), quelques centigrammes par litre.

Le nitrate de potassium se combine à l'hydrogène naissant, dégagé par les microbes ; parmi les produits résultant de la réduction de l'acide nitrique on trouve : l'acide nitreux, le bioxyde d'azote, le protoxyde et un peu d'azote libre, ces derniers se formant, bien entendu, aux dépens de l'acide azoteux. Comme ils sont peu abondants en regard du volume considérable d'hydrogène qui se combine à l'acide nitrique, leur dégagement passe inaperçu (1). On ne peut pas recourir à ce procédé pour empêcher la boursouffure des fromages à pâte molle ni même du gruyère ; l'acide nitreux qui prend naissance par réduction de l'acide nitrique, est un antiseptique très puissant ; à la dose de 1/5000 il arrête complètement la fermentation lactique, de sorte que l'usage du salpêtre produirait des accidents plus graves que ceux qu'il est appelé à supprimer.

La présence du *b. l. aerogenes*, passe le plus souvent inaperçue

(1) L'action du salpêtre dans le cas particulier qui nous occupe a été étudiée par MM. Bœkhout et de Wries. Ils attribuent ses effets à la propriété qu'il possède de permettre la vie aérobie dans la masse du caillé en raison de la facilité avec laquelle il cède de l'oxygène aux microbes. C'est ainsi, d'ailleurs, qu'on interprète les actions de dénitrification que l'on a observées dans tous les milieux fermentescibles où l'on rencontre des nitrates. Mes recherches personnelles, dont les résultats ne sont pas ici à leur place, prouvent que les phénomènes de dénitrification doivent être rattachés à l'assimilation de l'azote nitrique par les microbes et par les végétaux supérieurs. Le plus souvent la transformation de l'azote nitrique en ammoniac se fait sans formation de produits intermédiaires. Les microbes dénitrifiants permettent d'observer, dans certaines conditions, l'apparition de ces substances intermédiaires.

Dans ce cas particulier du *b. lactis aerogenes*, le nitrate de potassium ne supprime aucun des produits de la fermentation, pas même l'hydrogène, dont la formation se révèle par la production des dérivés oxydés de l'azote nitrique ; mais tous les produits de fermentation sont très sensiblement diminués : parce que l'acide nitreux est un antiseptique puissant pour les microbes qui le produisent. Il en résulte que la fermentation s'arrête plus vite. De petites quantités d'acides nitreux produisent le même effet que l'acide nitrique vis-à-

parce qu'il forme des produits de fermentations acides et des alcools qui s'allient bien avec la fermentation lactique, ce sont en effet : l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide propionique, l'alcool éthylique et l'alcool propylique ; mais un dégustateur exercé ne s'y trompe pas ; la présence de l'acide acétique en quantité anormale ne lui échappe pas. La fermentation propionique n'est vraiment normale que dans le gruyère ; mais ce n'est pas le *b. l. aerogenes* qu'on y rencontre. Ce microbe n'existe jamais dans les produits de bonne qualité.

Il existe à côté du *b. l. aerogenes* tout un groupe de ferments voisins difficiles à identifier, aussi difficiles à distinguer, qui sont confondus généralement sous le nom de *b. coli* ; ils possèdent les propriétés physiologiques du précédent et ils se rencontrent aussi dans le lait.

Une autre catégorie de ferments propioniques moins actifs, à développement plus lent, est très répandue dans les fromageries ; le *b. l. aerogenes* et les colibacilles sont tués par un chauffage de 5 minutes à 65-66° ; les ferments propioniques du gruyère résistent à cette température ; ils ont un rôle important à jouer dans la fabrication des fromages à pâte cuite.

Ce sont eux qui produisent dans le gruyère l'acide propionique et l'alcool propylique et ils donnent nécessairement de l'hydrogène ; c'est donc surtout l'hydrogène qui forme les yeux du gruyère et non l'acide carbonique seul qui se dégage lentement par diffusion en raison de sa grande solubilité.

On trouve encore les mêmes ferments propioniques dans du lait caillé spontanément, maintenu à l'abri de l'air. Ces microbes résistent à l'acidité du lait caillé mieux que les ferments lactiques et finissent toujours par donner au lait une odeur de gruyère.

Les ferments producteurs de mucilages et de gommes sont très fréquents aussi ; ce sont les agents de la maladie de la graisse classique des fromages. Cette graisse se distingue de celle qui est due à

vis du dégagement d'hydrogène produit par le *b. l. aerogenes* ; mais le développement des cultures est extrêmement faible.

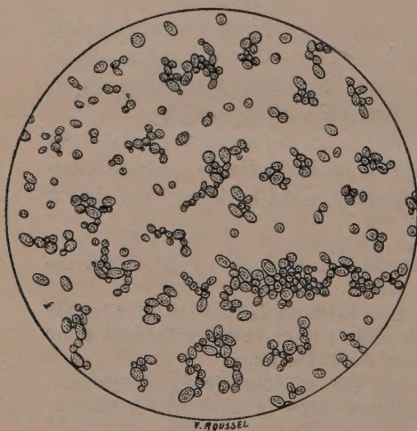
L'acide nitreux arrête radicalement la fermentation lactique à la dose de 1/5000. De petites quantités de nitrates introduites dans le lait retardent donc sa coagulation s'il renferme des microbes dénitrifiants.

L'usage du salpêtre, comme conservateur, vise toujours le développement du *b. l. aerogenes* et du *b. coli* et similaires dans la charcuterie comme dans quelques autres denrées alimentaires.

L'emploi du sous-nitrate de bismuth dans la thérapeutique est destiné aussi à combattre le dégagement d'hydrogène. On ne vise que l'hydrogène sulfuré, en principe ; mais la formation de sulfure de bismuth libère l'acide azotique dans l'intestin et, en réalité, c'est lui qui constitue le véritable remède contre la flatulence ; mais l'acide nitreux peut causer, on le sait, des intoxications graves, et il est possible que des cas d'intoxication mal définis dus à l'ingestion de viandes conservées puissent être attribués à ce corps.

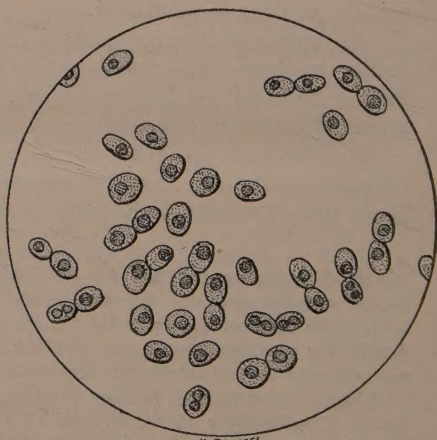
un égouttage insuffisant ou à une pullulation trop précoce des mycodermes et des oïdium, en ce qu'elle peut se manifester même après le développement de la moisissure. Elle apparaît à ses débuts sous forme de taches isolées, formant une saillie sensible à la surface du caillé ; ces taches gagnent peu à peu en surface et semblent détruire la moisissure qui disparaît devant elles. Quand on examine les microbes qui forment ces taches graisseuses on trouve surtout des mycodermes et des oïdium, avec des quantités énormes de chaînettes ressemblant à des ferments lactiques ; l'oïdium et le mycoderme pullulent en effet dans le mucilage formé par ces microbes ; en les associant dans des cultures artificielles sur des milieux solides on reproduit l'aspect caractéristique des taches graisseuses des fromages. Lorsqu'on examine les taches vieilles de plusieurs jours, on constate la présence d'un grand nombre de bacilles mobiles ; ce sont des microbes putréfiants, dont la présence se révèle par l'odeur nauséabonde qu'ils dégagent. Cette graisse aboutit donc comme la première à une véritable putréfaction du caillé, accompagnée d'une liquéfaction rapide.

Quand les fromagers constatent la présence de ces taches sur le caillé, ils les expliquent par une mauvaise répartition du sel, un salage irrégulier ; l'endroit infecté n'a pas reçu de sel. Ils semblent oublier que le sel, corps très soluble, se répartit également dans toute la masse du caillé en moins de 24 heures après le salage. Ce



V. ROUSSEL

Fig. 10. — Levure de lactose, transforme le sucre de lait en alcool et gaz carbonique.



V. ROUSSEL

Fig. 11. — *Torula aurantiaca* pullule sur le caillé acide en produisant une couleur jaune orange.

n'est donc pas le sel qui ferait défaut sur certains points, c'est tout simplement la dose employée qui est trop faible. Le sel détruit radicalement tous ces ferments, plus facilement que l'oïdium lui-

même ; s'ils produisent des taches grasseuses sur les fromages, c'est parce qu'ils ont été déposés dans les endroits malades, soit par les cagets, soit par les mains de fromagers ou encore par des gouttes d'eau tombées des plafonds.

Ces microbes sont très répandus dans l'eau et dans le sol ; ils existent donc toujours dans le lait et par conséquent dans le fromage et s'ils ne sont pas plus redoutables, c'est parce qu'on peut les éliminer facilement par les soins de propreté et la désinfection des ustensiles.

À côté des maladies que je viens d'examiner, je devrais placer les accidents dus au développement des levures de lactose (fig. 10) ; j'avais supposé tout d'abord que l'alcool qu'elles produisent pouvait prendre une part plus ou moins importante à la formation du bouquet ; mais elles sont si peu nombreuses, qu'il faut ensemercer des morceaux de caillé assez gros pour les découvrir ; elles n'influent donc ni sur le bouquet, ni sur la saveur et quand elles pullulent par suite d'une négligence quelconque, elles produisent toujours de l'amertume, surtout dans le caillé acide.

Quelques espèces de levure, de *torula* (fig. 11), de *mycoderme* donnent au caillé acide des couleurs variées. Toutes ces espèces ne résistent pas aux procédés ordinaires de désinfection et de nettoyage.

Moisissures nuisibles. Maladie du « noir ».

La maladie du « noir » est, avec les différentes formes de la grasse, l'accident le plus redouté des fromagers. Pour eux, c'est le blanc qui tourne au noir. « La moisissure fleurit d'abord blanc puis elle bleuit brusquement dans l'espace d'une nuit, puis elle verdit, puis elle prend enfin une teinte brune. » On ne saurait mieux décrire les différentes teintes que présente le *Penicillium glaucum*.

Les praticiens sont complètement désorientés par l'apparition du noir. Dans leur esprit, c'est la bonne moisissure qui se transforme sous l'influence de certaines causes qu'ils cherchent à préciser. Tantôt c'est la mauvaise qualité du lait, son acidité qu'ils incriminent ; l'humidité des locaux est souvent accusée ; la saison n'est pas sans influence non plus ; les fromages noircissent fréquemment vers le mois de février, de mars ou d'avril, c'est-à-dire en fin de saison, rarement en septembre et octobre. Or, toute la bonne volonté dépensée en rapprochements de ce genre est déployée en pure perte.

Sous le nom de *Penicillium glaucum* (fig. 8), on confond tout un groupes d'espèces de moisissures nuisibles, capables de se développer sur le caillé acide aussi bien, sinon mieux que le *Penicillium album*, auquel elles se substituent fréquemment pour diverses raisons que je vais exposer.

Règle générale, tous les établissements neufs au moment de la

mise en exploitation sont envahis par le « noir » et cela quelles que soient les précautions que l'on prenne pour y apporter la bonne moisissure.

Le *Penicillium glaucum* trouve donc dans les locaux neufs des conditions qui favorisent son développement. Le lait est pourtant le même que dans une fromagerie voisine où la fabrication réussit très bien avec moins de soins.

Le propriétaire de l'usine neuve possède quelquefois deux ou trois autres exploitations dans lesquelles il fait merveille. Il déploie dans sa nouvelle installation la même habileté avec plus d'activité encore, il met en œuvre exactement les mêmes procédés, surveille le lait, contrôle le chauffage, règle les températures, emploie la même pré-sure qu'il connaît depuis des années, appelle de nouveaux employés de ses deux ou trois autres fromageries, y renvoie les maladroits qu'il avait pourtant reconnus autrefois comme les plus habiles, et comme résultat : toujours du noir. Cela dure quelquefois un an, deux ans, et plus, avec des interruptions plus ou moins prolongées que l'on met à profit pour désinfecter au lait de chaux, pour tout nettoyer. On repart, et pendant quelques jours il semble bien que le mal est vaincu ; mais le plus souvent le noir revient, plus abondant et plus envahissant que jamais. Puis un beau jour, généralement après une interruption prolongée pendant la saison chaude, et sans qu'on sache à quelle cause attribuer le changement, on constate que la fabrication réussit à souhait ; le « noir » a bien voulu disparaître pour laisser la place à la bonne moisissure.

Voilà donc des accidents contre lesquels l'expérience la plus consommée demeure impuissante. Cependant, les plus clairvoyants ont constaté que les fromageries doivent être installées dans des bâtisses anciennes si on veut éviter ces accidents, car ils prétendent que c'est l'humidité du plâtre qu'il faut en accuser. D'autres, toujours pour la même raison, bâtissent mais n'exploitent que plusieurs années après. C'est une précaution qui peut être utile ; elle n'est ni nécessaire, ni suffisante, et quand elle paraît réussir, cela n'est pas dû à la sécheresse des plâtres, sur lesquels l'eau ruisselle nuit et jour, aussi longtemps que dure la fabrication.

Il faut donc trouver autre chose.

Chacun sait que les bois blancs et même les bois durs de nos régions, débités en planches et exposés aux intempéries, se recouvrent toujours de poussières vertes. Les marchands de bois qui suivent de près la formation de ces taches, savent de plus que la couleur verte ou brune est toujours précédée d'une moisissure blanche, très peu apparente. Cette moisissure blanche n'est autre que le *P. glaucum* et la poussière verte ou brune qui lui succède, c'est sa graine, ses spores, comme disent les botanistes.

Les boiseries neuves des fromageries sont donc placées dans des conditions idéales pour porter et entretenir le *P. glaucum*. Ce cham-

pignon trouve, dans le bois blanc surtout, tout ce qui est nécessaire à son alimentation et la fromagerie lui apporte la chaleur et l'humidité ; il s'y installe donc en quelques jours pour rester autant que durent les substances nutritives (sucre, amidon, gommés, résines, matières pectiques, matières azotées et minérales du bois), c'est-à-dire, des années quelquefois. Voilà pourquoi le « noir » fait son apparition en même temps que sèche le plâtre ; il y a là une simple coïncidence.

De la boiserie, le « noir » se propage naturellement sur les fromages jeunes, et c'est là le mauvais côté de l'affaire, car il est alors entretenu par le fromager lui-même.

Les vieux locaux, les fromageries anciennes ne sont pas exempts de « noir », mais il y entre par d'autres voies, car les boiseries vermoulues ont déjà nourri d'innombrables générations de moisissures. Les cagets, les planches, les fromages avariés, qu'on laisse dans des endroits humides ou qu'on abandonne longtemps dans les coins, se couvrent de *P. glaucum* et aussi de *mucors*, rarement d'*aspergillus* ou de *botrytis* (fig. 12). Les cagets neufs qui sont mis en usage sans être ébouillantés sont une cause de contamination lorsqu'ils sont de mauvaise qualité. En un mot, tous les ustensiles, tous les matériaux susceptibles de moisir, doivent être l'objet d'une surveillance rigoureuse et constante.

Enfin, une dernière cause d'infection vient de la fâcheuse habitude qu'ont les fromagers de mettre en route une nouvelle fabrication sans utiliser des cultures de moisissures. Le *P. album* n'est pas abondant dans la nature ; si on ne l'introduit pas dans la fromagerie il met un temps très long à s'y installer. Les germes du *P. glaucum* qui existent toujours dans l'air, se chargent de peupler le caillé, et c'est toujours ce que l'on observe.

Les causes d'infection étant connues, il devient facile de les éviter. Les boiseries neuves ne doivent jamais être assemblées sans avoir été, au préalable, injectées ou imbibées de sulfate de cuivre (solution à 2 %). On procède à cette opération lorsque le bois est débité. Une fois monté, on le recouvre d'une légère couche de lait de chaux.

Les murs doivent être badigeonnés aussi à la bouillie bordelaise mais sans revêtement de lait de chaux.

Tous les ustensiles portatifs en bois ou en paille réclament des ébouillantage et des nettoyages journaliers. Lorsqu'ils ont séjourné quelque temps dans les magasins, il est prudent de ne les mettre en usage qu'après les avoir passés dans l'eau bouillante ou désinfectés dans une étuve à vapeur, procédé beaucoup plus pratique.

On ne peut procéder de la même façon vis-à-vis des fromages infectés ; il est cependant nécessaire de prendre des mesures énergiques à leur égard. Quand on peut interrompre la fabrication, on procède à une désinfection générale par les procédés indiqués, puis

on aère longuement pendant trois ou quatre jours et on repart avec des cultures pures de ferments.

Quand on ne peut pas arrêter la fabrication, l'opération devient extrêmement difficile à conduire. On se trouve en effet en présence de deux causes de contamination difficiles à éviter : le transport des spores par l'air, d'un local à l'autre et la contagion par le contact, l'ouvrier servant d'intermédiaire entre les fromages malades et ceux que l'on vient de fabriquer.

Les fromages couverts de « noir » portent, on le sait, une couche de poussière d'un vert foncé qui s'envole au moindre choc. Cette « fumée » n'est autre chose qu'un nuage formé de milliards de spores qui iront se déposer partout dans la fromagerie au hasard des courants d'air.

Pour supprimer cette cause de dissémination, il n'y a qu'un moyen : c'est d'abord d'écouler tous les produits susceptibles d'être vendus. On fait ainsi de la place pour les autres que l'on isole dans une cave ou dans un séchoir qui se prêtent à une suppression complète de toute communication avec les autres locaux. Les employés chargés de retourner ces fromages malades ne doivent, sous aucun prétexte, pénétrer dans les autres pièces.

Celles que l'on a ainsi débarrassées sont désinfectées rapidement,

Ce moyen réussit toujours quand le personnel exécute ponctuellement les ordres qu'on lui donne ; pour plus de sécurité, on fait usage, pendant la période de transition, de plus fortes quantités de ferments. Quand la place est bien garnie de bonnes espèces, les mauvaises ne peuvent plus s'y installer pour produire les milliards de graines que représente un seul « bouton » de noir.

A côté du *Penicillium glaucum*, on rencontre dans les fromageries un champignon noir ; c'est le *Racodium cellare* ; il pousse sur les murs, et les boiseries en formant des taches étoilées, rouges au début, puis d'un noir de suie, lorsqu'elles vieillissent ; cette moisissure ne se développe pas sur les fromages à pâte molle, égouttés spontanément ; elle envahit au contraire le Port-du-Salut dans les fromageries mal tenues, forme des taches versicolores sur la croûte et finit par se localiser dans les dépressions qu'elle provoque ; les points envahis sont profondément altérés, et la saveur de la pâte y est d'une amertume très prononcée.

Le fromage de Roquefort est parfois envahi par une moisissure particulière, l'*Isaria casei*. Cet *Isaria* se substitue au *P. Roqueforti* sur le pain moisi ; ses spores sont en effet vertes comme celui de la bonne moisissure ; mais l'*Isaria casei* ne sporule pas dans la pâte ; les trous sont bien garnis d'une feutrage mycélien blanc ; mais la couleur bleue, le persillé ne se produit pas.

Maladies du caillé alcalin.

Les ferments nuisibles, capables de se développer dans le caillé alcalin sont légion ; on le conçoit sans peine, car à la surface et dans l'intérieur de ce caillé, les bactéries de la putréfaction peuvent pulluler suivant qu'elles cherchent le contact de l'air ou fuient sa présence.

L'acidité produite par les ferments lactiques en fait périr un grand nombre d'espèces ou arrête le développement de celles qui résistent longtemps à la réaction acide ; mais comme celle-ci est destinée à disparaître pour faire place à une réaction alcaline, les espèces nuisibles qui survivent reprennent leur activité, dès que cette transformation s'est accomplie.

Il est extrêmement difficile de faire un exposé succinct des espèces bactériennes, capables d'altérer le fromage au moment où s'opère la solubilisation partielle de la caséine ; je me contenterai donc de définir leurs divers modes d'action.

Ceux-ci traduisent par la « coulure », par la production abondante d'ammoniaque, par la formation de produits volatils qui sont presque toujours les agents avertisseurs des phénomènes de putréfaction. Nous connaissons déjà les coulures précoces provoquées par une végétation superficielle trop luxuriante ; nous connaissons aussi les putréfactions anticipées qui se greffent sur ces coulures parce que la peau humide s'alcalinise rapidement.

La coulure plus tardive se manifeste à un âge plus avancé du caillé dans la cave d'affinage, et généralement elle est moins grave. Elle consiste en une solubilisation trop avancée de la caséine et suppose par conséquent l'intervention de grandes quantités de caséase ; on peut donc soupçonner à bon droit la présence de *b. subtilis* (fig. 13), parmi les ferments du « rouge ». Je ne les y ai jamais rencontrés ; ce sont donc d'autres espèces qui doivent être rendues responsables de cet accident, et on n'a que l'embarras du choix ; j'ai isolé fréquemment des fromages coulants une espèce liquéfiant qui ressemble aux bacilles subtiles, mais qui en diffère en ce qu'elle ne produit pas de spores ; elle solubilise la caséine, le sérum sanguin coagulé, la gélatine plus vite que les *b. subtilis* les plus actifs. Quand ce bacille est abondant sur les fromages, la pâte se transforme rapidement en une sorte de crème fluide. Le lait soumis à son action devient limpide en 48 heures, et bientôt on voit dans le dépôt muqueux, une grande quantité de doubles pinceaux de tyrosine.

La coulure est due aussi à l'ammoniaque ; les ferments producteurs d'ammoniaque sont très nombreux ; ils liquéfient la gélatine, et forment sur les milieux peptonés de longues aiguilles de phosphate ammoniac-magnésien. La coulure, due à un grand excès d'ammoniaque, se reconnaît facilement aux déchirures que présente la peau. L'ammoniaque semble en effet enlever sa souplesse à la peau ; quand la pâte se liquéfie, elle marque une tendance assez forte



Fig. 42. — Organes fructifères. — 1. *Penicillium*. — 2. *Mucor*. — 3. *Sterigmatocysti* (*aspergillus*). — 4. *Botrytis*. a) faible grossissement; b) fort grossissement; c) spores isolées.

à la déformation, la peau incapable de se distendre, se déchire en découvrant de larges plaques semi-fluides.

Si le fromage renferme peu d'eau, la peau ne se déchire pas et la liquéfaction est peu sensible, même en présence d'une alcalinité très élevée. On observe alors chez les fromages gras une saponification très nette provoquée par l'ammoniaque. Les acides gras mis en liberté forment des sels ammoniacaux, dont les aiguilles cristallines enchevêtrées produisent une assise superficielle qui se détache de la masse sous-jacente par sa couleur plus claire.

Ce phénomène se présente d'une façon frappante chez les camemberts un peu aqueux qui restent trop longtemps en boîte ; on les enveloppe généralement de papier sulfurisé ou plus fréquemment encore de papier paraffiné. L'un et l'autre sont peu perméables aussi bien à l'air qu'à l'ammoniaque. Les ferments superficiels sont donc ainsi privés d'air ; ils cèdent le pas à des bactéries anaérobies, dont la présence se révèle par la formation de grandes quantités d'ammoniaque. Le « rouge » disparaît ; la masse glaireuse humide qui recouvre le fromage possède une teinte gris pâle, de mauvais aspect ; si l'on râcle les parties superficielles composées surtout de corps microbiens, on constate que la pâte grasse que l'on met à jour prend un aspect moiré ; ce sont les aiguilles de sels ammoniacaux à acides gras qui provoquent ces phénomènes de diffraction en s'orientant toutes dans le sens du râclage. Pour se conserver en boîte, le camembert doit trouver, dans les procédés d'emballage, les mêmes conditions de milieu que dans la cave d'affinage, c'est-à-dire une aération modérée, une humidité convenable, et surtout une atmosphère peu chargée en ammoniaque. L'usage du papier sulfurisé ou paraffiné est une pratique malheureuse ; beaucoup de fabricants l'ont vite reconnu et se sont empressés de recourir au papier finement ajouré, qui gêne l'évaporation et permet l'aération modérée et le dégagement d'ammoniaque.

La saponification des matières grasses s'observe fréquemment aussi chez les fromages à pâte pressée comme le port-du-salut, le maroilles ; elle est localisée sur certains points, là où la croûte a été entamée. Ces fromages lavés sont en effet recouverts de ferments ammoniacaux très actifs ; mais l'ammoniaque pénètre difficilement à travers la croûte cornée qui la protège ; si celle-ci fait défaut sur quelque point, l'alcali s'y concentre, et on voit s'y produire une sorte d'ulcère gangréneux à odeur nauséabonde qui se présente tout d'abord sous la forme d'une légère excroissance grisâtre produite par le foisonnement des cristaux de sels ammoniacaux.

Je signalerai enfin le noircissement des régions superficielles de la pâte du brie et du camembert. Cet accident indique aussi la présence de ferments nuisibles ; c'est toujours à la surface que cette couleur se produit et elle débute par un bleuissement. Quand les ferments mélanogènes sont rares, on constate la présence de taches brunes correspondant à des colonies isolées sur une coupe exposée



Fig. 13. — Quelques échantillons de *b. subtilis* isolés du lait. Ferments aérobies mobiles solubilisent la caséine plus ou moins rapidement (V. Pl.VIII), ne se rencontrent pas sur les fromages parce que les ferments lactiques empêchent leur développement.

s'ils sont nombreux, toute la section brunit ⁽¹⁾. Ces microbes viennent quelquefois du lait directement ; le plus souvent ils existent sur les cagèts trop vieux et ne tardent pas alors à se généraliser dans la cave.

Tous ces accidents sont très fréquents, mais ils apparaissent de préférence sur les fromages avancés ; c'est pour cela qu'ils attirent moins l'attention des fabricants ; mais ils indiquent aux connaisseurs la présence de mauvais ferments, et montrent qu'en réalité il existe peu de produits qui ne portent que des ferments utiles.

Les mauvaises espèces se généralisent trop souvent dans les fromageries, parce que la notion de contagion appartient, pour le praticien, au domaine de la théorie. On voit ainsi, communément, des fromagers s'exposer aux complications les plus dangereuses, en procédant dans les mêmes locaux à la fabrication de deux variétés de fromages aussi différentes que le camembert et le port-du-salut. Le camembert est un fromage d'hiver ; le port-du-salut est plus demandé en été parce qu'il résiste mieux aux températures élevées. Ce dernier est moulé et égoutté mécaniquement au moyen de presses appropriées. Salé et séché il est soumis à un travail d'affinage qui consiste en lavages plus ou moins fréquents, effectués avec un linge imbibé d'eau modérément salée. La croûte qui reste toujours humide se recouvre d'une épaisse couche de ferments qu'on enlève par râclage avant de livrer les fromages aux détaillants. Je n'ai pas besoin de dire que dans cette masse glaireuse d'un rouge plus ou moins foncé, tous les microbes des matières azotées sont bien représentés. Il n'y a pas de place, dans cette coutume, à la moindre sélection des espèces. Si l'on veut se procurer des microbes doués des propriétés physiologiques les plus singulières, c'est là qu'il faut aller les chercher, aussi bien d'ailleurs que sur les fromages de livarot, de münster, de maroilles, etc..

Ce qui importe ici c'est qu'il s'y trouve des espèces capables d'envahir le camembert, le brie, le coulommiers, au détriment des ferments utiles, dont les caractères sont très bien déterminés et les espèces très limitées. Il en résulte que chaque fois qu'on procède à deux fabrications différentes dans les mêmes locaux, suivant la saison, ou qu'un même personnel est chargé d'assurer deux fabrications simultanées dans des locaux différents, on peut être certain que les ferments des fromages lavés envahiront les fromages moisiss.

Le camembert, par exemple, ne présente rien d'anormal jusqu'à l'épanouissement de la moisissure ; mais les ferments des fromages lavés apparaissent avant les bonnes espèces. Ils forment des taches humides, d'un jaune rougeâtre caractéristique ; ces taches évoluent rapidement et gagnent en étendue en détruisant la moisissure. Quand les parties superficielles des fromages présentent une réaction alcal-

(1) Le microbe du lait bleu s'observe plus rarement ; cependant il peut envahir le gruyère ; la pâte du fromage devient alors uniformément bleue sur une section exposée quelques minutes à l'air.

line, la couleur passe au rouge foncé et rappelle naturellement le rouge des fromages lavés puisqu'il lui est identique.

Ce rouge est très hygroscopique ; exposés à des courants d'air violents, les fromages qui le portent paraissent toujours mouillés ; s'ils ne sont pas fortement égouttés ils coulent ; ils ont bien la forme des camemberts, mais ils n'en possèdent ni le goût, ni l'odeur ; ils se rapprochent sous ce point de vue des fromages lavés ; ils sont amers, forts, piquants, parce que les produits de décomposition avancée de la caséine, les sels ammoniacaux, l'ammoniaque libre, s'y accumulent.

Des fromages qui possèdent ces caractères existent dans le commerce ; ils ne se vendent pas sous le nom de camembert, ils portent le nom de fromages de Tholy, des Vosges. Ils dérivent en droite ligne du münster ou du géromé, qui se fabriquent dans les fermes des environs de Gérardmer. M. Gérard de Tholy ayant tenté l'industrialisation du münster, s'est heurté à des difficultés très grandes dues à l'acidité du lait. Le münster ne peut être fabriqué, en raison de son volume, qu'avec du lait frais ; M. Gérard a dû laisser agir les moisissures afin de débarrasser le caillé de l'acidité qui en rendait l'affinage impossible ; il a constaté ainsi que les fromages gagnaient en finesse, et par l'observation et l'expérience il a été conduit à découvrir les principes de la fabrication du maroilles ; mais en même temps, il a adopté la forme et le volume des camemberts et il a obtenu ainsi, tout naturellement, un fromage à goût de münster avec le « rouge » de münster et qui présente sur ce dernier l'énorme avantage d'être plus doux, moins amer, et moins ammoniacal, parce que l'affinage se faisant en quelques semaines ne provoque pas de dégradation aussi avancée de la caséine. L'accueil qu'il a trouvé auprès des consommateurs de münster et analogues, prouve que M. Gérard a rencontré la bonne voie.

VI. — SÉLECTION EMPIRIQUE DES FERMENTS DES FROMAGES A PÂTE MOLLE.

Nous voici maintenant bien placés pour faire un retour en arrière et jeter un coup d'œil rétrospectif sur les procédés de fabrication tels qu'ils ont dû se dérouler dans le temps. La fromagerie est d'origine modeste comme la beurrerie, dont elle est restée certainement longtemps, une sous-industrie peu importante. On a d'abord conservé du lait, la partie la moins altérable et en même temps celle que le profane considère à tort, comme la plus précieuse au point de vue alimentaire, le beurre. Le beurre est assurément une graisse de luxe ; mais c'est une graisse, la caséine possède les qualités alimentaires de la viande. En conservant la caséine on fait donc des réserves d'aliments azotés qui jouent dans l'économie domestique le même rôle que les viandes conservées. Bien entendu, on a conservé les fromages par les mêmes procédés que la viande et c'est en utilisant le sel marin comme conservateur que les fermiers ont d'abord soustrait les fromages aux agents de la putréfaction. On a vu en effet quels services le sel peut rendre aux fromagers ; presque toutes les maladies

des fromages cèdent à un salage énergique, le « noir » excepté ; mais si on ne considère que le rôle chimique des moisissures, on constate que le *P. Glaucum* y remplit la même fonction que le *P. Album* et le *P. Candidum*. Si le fabricant de camembert et de brie cherchent à éviter le « noir », c'est moins pour le mauvais goût qu'il communique au fromage, que pour l'aspect désagréable et fort peu estimé qu'il lui donne. J'ai rencontré bien des fois des fromages de brie de qualité irréprochable qui ne portaient que du *P. Glaucum*, mais toujours à l'état de feutrage léger, peu sporulé, et par conséquent peu teinté.

Le sel a donc été l'agent de conservation le plus précieux des fabricants de fromage et aujourd'hui encore on en abuse beaucoup.

Mais peu à peu, avec les progrès réalisés en laiterie, c'est la fermentation lactique qui s'est substituée au sel marin dans son rôle d'agent conservateur ; mais les ferments lactiques présentent en outre l'avantage énorme d'assurer la régularité de la fabrication depuis le moment où le lait est mis en présure, jusqu'au jour où il est livré à la consommation, et de développer dans la masse de la pâte les qualités gustatives qu'on lui réclame.

On a donc restreint de plus en plus la part qui revient au sel marin ; la clientèle a suivi et même encouragé cette évolution, car ses préférences vont sans hésitation aux produits peu salés. La finesse est en raison inverse de la quantité de sel employé.

Le sel est un antiseptique qui agit en effet aussi bien sur les bonnes fermentations que sur les mauvaises. Dans les fromages fortement salés, les ferments lactiques sont tués au bout de quelques jours. L'oïdium disparaît radicalement, les mycodermes (fig. 3) et la moisissure résistent, mais évoluent très lentement. Parmi les ferments du rouge le gros bacille à bouts arrondis qui ne prend pas le Gram persiste également (fig. 11). D'un autre côté, l'action des diastases est à peu près empêchée ; l'affinage est donc ralenti ; les fromages salés ne s'affinent qu'avec le concours de grandes quantités d'ammoniaque ; les pratiques qui consistent à les placer dans le foin, les feuilles mortes, la terre, les cendres, le marc de raisin, etc., n'ont pas d'autre but que de leur procurer une atmosphère fortement

Quand on a pu renoncer sans danger au sel marin, on a délaissé ammoniacale, hors de laquelle ils resteraient très longtemps acides. tous ces procédés et on s'est attaché à combattre les mauvaises fermentations en assurant le séchage méthodique du caillé et en réglant les conditions de température. L'influence de ces deux facteurs a été mise en relief, p. 414 et 417.

Pour en tirer le meilleur parti on a divisé la fromagerie en un certain nombre de locaux indépendants où s'accomplissent les fermentations successives dans des conditions de température et d'humidité bien appropriées.

Le séchage des fromages et le réglage des températures sont

encore réalisés avec la préoccupation d'éviter les altérations dues aux ferments de maladies.

Règle générale : les fromages séchés et affinés à basse température sont les plus fins, toutes conditions égales d'ailleurs. Les ferments nuisibles qui s'associent aux ferments du rouge sont moins à craindre, parce qu'ils ne pullulent qu'à des températures élevées. Les bonnes espèces se développent sensiblement à 6 et 7° : les champignons également ; mais les ferments de putréfaction, les ferments producteurs de caséase, recherchent plutôt les températures élevées. C'est entre 35° et 40° qu'il se développent le plus vite, tandis que les ferments du rouge, restent inertes ; la température la plus favorable pour ces derniers est comprise entre 22° et 27° ; mais il faut bien se garder d'atteindre le degré *optimum* ; plus on se rapproche du degré minimum (6 ou 7°), plus on est à l'abri de l'intervention des espèces nuisibles. L'expérience a montré que la température du séchoir ne doit pas dépasser sensiblement 15° et celle de la cave 12°. Ce sont là des chiffres qui correspondent à un travail effectué dans les conditions ordinaires, c'est-à-dire en présence des espèces microbiennes nuisibles qui sont toujours prêtes à causer des perturbations dans la marche des fermentations.

Les règles posées par la pratique peuvent être modifiées avantageusement si on se rend maître des fermentations, en ne tolérant que les espèces utiles. Dans l'industrie il y a souvent intérêt à aller vite et par conséquent à faire usage de températures élevées ; il y a également des avantages à ralentir le travail des microbes à certains moments où la consommation diminue ; c'est là aussi un résultat qu'il est facile d'obtenir par l'abaissement de la température des locaux.

En résumé, l'industrie fromagère s'est développée surtout grâce à l'usage qu'on a fait du sel marin comme antiseptique ; le séchage du caillé et le réglage des températures dans les différentes pièces de la fromagerie ont permis de corriger, dans une certaine mesure, les irrégularités que l'égouttage et le salage ne parvenaient pas à faire disparaître entièrement. Le rôle de la fermentation lactique s'est affirmé lentement ; mais son emploi raisonné supprime toutes les autres pratiques parce qu'elle constitue le seul facteur capable d'assurer la régularité du travail, condition sans laquelle la fromagerie ne saurait être envisagée comme une véritable industrie.

Si au lieu de considérer les moyens mis en œuvre pour diriger les fermentations, on envisage maintenant les procédés utilisés pour propager les ferments utiles, on constate que les fromagers ont recours à toutes les pratiques connues et appliquées dans les diverses industries de fermentations.

La fermentation lactique s'obtient à l'aide de levains ; les moisissures et les ferments du « rouge » s'ensemencent par l'intermédiaire des cagets ; et de temps à autre il est d'usage de renouveler ces fer-

ments par des emprunts ou des achats de cagets faits aux différentes fromageries réputées pour leurs produits.

Ces procédés d'ensemencement réussissent tant bien que mal, car le succès dépend plus de la fabrication et de l'organisation des locaux que de la présence des ferments utiles. Il y a cependant dans ces coutumes un fait qui attire l'attention des connaisseurs : c'est l'ignorance des dangers qu'elles comportent ; les fromagers ne voient pas qu'ils jouent avec une arme à double tranchant capable de propager aussi bien les mauvais ferments que les bons ; mais lorsque leurs prévisions sont déçues ils ont toujours une raison toute prête pour justifier les insuccès ; c'est la mauvaise qualité du lait.

Quand on entre dans le détail des applications de ces divers procédés empiriques ; on est surpris aussi de constater combien sont nombreuses les lacunes qu'elles présentent ; c'est une situation qui s'explique par l'origine toute moderne de la véritable industrie. La première fromagerie industrielle de pâtes molles a été fondée en 1856. par M. Bailleux ; il n'avait donc comme base technique aucune notion scientifique et c'est grâce à sa ténacité et à son esprit d'observation qu'il a surmonté des difficultés sans nombre dont on se fait aujourd'hui une idée exacte. L'usine qu'il a créée, dirigée aujourd'hui par M. Desoutter, est à l'heure actuelle la plus importante et la plus prospère de France. Il a trouvé des imitateurs parmi les membres de sa famille. M. Guérault-Godard, à Fère-Champenoise, M. Adrien, près de Sainte-Menehould, l'ont suivi dans la voie qu'il avait indiquée et toute la région de l'Est n'a pas tardé à profiter de l'exemple. Rien d'étonnant alors dans cette impression d'industrie mal assise que donne encore l'industrie des fromages à pâte molle.

C'est ainsi par exemple que l'usage des levains de ferments lactiques ne s'est pas généralisé dans le monde des industriels ; et si les deux autres groupes de ferments se sont acclimatés dans les fromageries, c'est un peu par la force des choses.

L'acclimatation du *P. Album* se fait naturellement ; mais elle demande quelquefois des années, car avant de s'installer à demeure et de se substituer au *P. Glaucum* qui est toujours le premier occupant, il doit attendre que celui-ci abandonne la place suivant le procédé que j'ai exposé p. 443.

Le *P. Album* est en effet la seule espèce du groupe des *Penicillium*, qui soit capable de se développer sur les murs, les étagères et les plafonds des fromageries en l'absence de tout aliment organique apporté par les éclaboussures de lait ou de petit-lait.

Il tire ses aliments minéraux des boiseries vermoulues ou des matériaux de construction, son azote de l'ammoniaque qui se dégage des fermentations, ses aliments carbonés de l'alcool et de l'acide acétique toujours présents en petites quantités dans l'atmosphère de l'usine

Il apparaît à l'état de touffes blanches plus ou moins serrées qui se développent très lentement, sporulent peu mais assez pour assu-

rer l'ensemencement des fromages, même dans les moules. Le *P. Album* se montre ainsi partout où séjournent les fromages, le lait ou le petit-lait, et on en voit autant dans la porcherie que dans la fromagerie.

On s'explique donc que le *P. Album* soit devenu la moisissure des fromages affinés.

Le *P. Candidum* ne peut pas se perpétuer ainsi dans les locaux ; ce sont les fabricants de fromages blancs, coulommiers doubles-crèmes et bondons frais ou affinés qui le recherchent de préférence à l'autre moisissure ; mais ils l'ensemencent directement dans le lait ou le caillé en y pulvérisant un morceau de fromage bien moisi ; si par hasard, l'une des deux autres espèces s'y trouvent en même temps, les fromages deviennent bleus ou noirs car le *P. Album* et le *P. Glaucum* produisent bien plus de spores que le *P. Candidum* (fig. 8).

Les bactéries qui produisent le « bon rouge » comme disent les praticiens ne se rencontrent pas à l'état spontané dans le lait. Pour les voir pulluler dans la fromagerie il faut les y introduire, et surtout les conserver. Les habitudes établies dans le commerce exigent que les fabricants vendent leurs produits au moment où ces microbes commencent à se développer. Le fabricant exporte donc toujours des ferments et il arrive souvent que la fromagerie s'en trouve dépourvue. De là, la coutume des ensemencements par les cagets qui finissent toujours par faire perdre le « bon rouge ». J'en ai donné les raisons, je n'y reviendrai pas.

Ce qu'il faut retenir de tout cet aperçu rapide sur l'évolution empirique de l'industrie fromagère, c'est que ses procédés manquent de précision et de sûreté. C'est une industrie qui cherche sa voie et progresse péniblement en raison des difficultés très grandes qu'elle oppose même aux plus fins et aux plus persévérants des observateurs.

J'espère que ceux qui sont en mesure de saisir les indications précises que j'ai données dans les chapitres précédents y trouveront la justification de leurs succès aussi bien que de leurs échecs. Ils trouveront, en particulier, que leurs préventions contre le lait, sont souvent justifiées par les résultats ; il s'agit de les faire disparaître, c'est-à-dire de rectifier l'état de la matière première de façon à la rendre propre à la fabrication de produits de bonne qualité ; c'est ce point que je vais aborder maintenant.

VII

INFLUENCE DE LA QUALITÉ DU LAIT SUR LA FABRICATION. NÉCESSITÉ DE LA PASTEURISATION

L'industriel fabrique du bon beurre, ou du bon fromage, quand il dispose de bon lait. N'a pas de bon lait qui veut, car le bon lait est un privilège des régions qui possèdent de bons pâturages. Il y

a des crus de lait comme il y a des crus de vins, et ceux qui n'ont pas le bonheur enviable d'habiter des régions privilégiées doivent se contenter de la modeste situation que la nature leur impose.

Ainsi raisonnent trop souvent les praticiens ; les uns mettent beaucoup trop d'empressement à se refuser le mérite qui leur revient ; les autres, trop de résignation à accepter le malheureux sort qui leur est dévolu. Il y a des crus de vins parce qu'il y a des raisins très riches en sucre, parce qu'il y a des cépages qui produisent des fruits bouquetés, qu'il y a des maîtres de chai qui savent tirer parti de leurs matières premières, qu'il y a enfin des propriétaires qui en imposent à la mode ; il n'y a pas de crus de lait susceptibles de créer des crus de beurre ou de fromage, parce qu'il existe entre les fourrages et le lait qui en dérive une machine animale qui élabore, aux dépens des premiers, tous les éléments dont se compose le second. L'organisme sain, nourri convenablement, travaille régulièrement. Je sais bien que l'on peut citer des exceptions ; mais ces exceptions sont connues et par conséquent faciles à éviter.

Il est facile de rappeler des exemples qui fournissent une démonstration éclatante de la règle :

Deux fermiers voisins fabriquent du beurre ; leurs pâturages se touchent, leur bétail se compose d'individus appartenant à la même race, l'un fait d'excellent beurre, l'autre fabrique un produit médiocre. Supposons qu'ils échangent leurs fermes et leurs troupeaux ; personne n'admettra que le premier ne continuera pas de préparer une denrée de première qualité avec la matière première du second et *vice-versa*. Le cru c'est donc l'homme ? Oui, mais encore à côté de cet exemple trop favorable à la soutenance d'une thèse, on peut en citer d'autres qui sont d'accord avec la conception opposée. Les mêmes plantes fourragères poussant dans des régions différentes, ne possèdent pas la même composition, ni la même richesse en produits volatils, susceptibles de passer dans le lait ; voilà pourquoi les produits qui en dérivent ne possèdent pas les mêmes qualités. Quand on cherche à vérifier ce qu'il y a de fondé dans cette assertion, on trouve que les différences de qualité doivent être attribuées à des causes plus immédiates qui relèvent des fermentations. Voici un industriel qui se trouve dans l'obligation de construire une seconde fromagerie dans le rayon d'alimentation de son premier établissement. Il va sans doute fabriquer de meilleurs produits dans sa nouvelle usine, puisque les conditions de transport deviennent plus favorables. Eh bien, malgré toute son expérience il réussira beaucoup moins bien, tant que les ferments utiles n'auront pas éliminé les mauvaises espèces. Les résultats valent ce que valent les fermentations ; à l'heure actuelle il ne faut pas songer à chercher des améliorations ailleurs que dans cette voie, à moins que l'on ne se place délibérément sur le terrain des exceptions qui consistent à faire consommer au bétail des aliments, dont la mauvaise qualité est bien établie. Et si vraiment les fourrages ont d'autres influences que celles

qui tiennent à leur richesse, il ne faut pas songer à les mettre en évidence avant de se rendre absolument maître de la nature des fermentations et des conditions qui leur permettent de donner les meilleurs résultats.

Il y a des laits riches et des laits pauvres, la richesse étant attribuée autant à la teneur en caséine qu'à la quantité de matières grasses. La production de lait riche est un attribut de la race, de l'individu même. Lorsqu'on cherche à augmenter la richesse du lait au moyen d'une alimentation normale, sans dépasser la puissance d'élaboration de la machine animale, on constate que le rendement en lait augmente en quantité et non pas sensiblement en richesse. Mais quelle que soit la richesse du lait, il renferme toujours assez de caséine, de sucre de lait, dont le taux est d'ailleurs à peu près fixe, pour assurer largement le développement des ferments utiles. Le rendement en produits manufacturés seul varie si l'on tient compte du volume initial de matière première mise en œuvre.

Il y a des laits qui ne renferment pas de bactéries nuisibles et qui n'ont subi aucune altération, et des laits qui sont fortement contaminés, qui sont même plus ou moins altérés dans leur composition. Les premiers sont susceptibles de fournir de bons résultats dans des conditions bien déterminées, les autres ne peuvent donner que des produits de qualité médiocre. Les laits contaminés qui n'ont pas subi d'altérations ne sont pas à l'abri des mauvaises fermentations, puisque celles-ci peuvent se déclarer au cours de la fabrication, à mesure que se réalisent les conditions d'acidité ou d'alcalinité qui les favorisent.

Et comme le lait contaminé est pour ainsi dire un mal nécessaire imposé à l'industrie, il est indispensable d'attribuer à cet état de choses toute l'attention qu'il mérite. Les améliorations ne sont possibles que dans la mesure où on réduit la contamination et les altérations qui en dérivent. Les praticiens reconnaissent l'exactitude de cette affirmation, mais ils s'avouent incapables de remédier à la situation dans laquelle ils sont placés. La contamination est difficile à éviter ; mais les altérations peuvent être retardées et fortement atténuées par la réfrigération du lait dès la traite. Voilà déjà un résultat que chaque cultivateur peut assurer en plongeant les récipients à lait dans l'eau froide.

Si l'industrie peut se procurer une matière première inaltérée au prix de soins aussi simples, elle ne doit pas se lasser de le répéter à ses fournisseurs, car il y va de l'intérêt de tous. Elle doit se charger ensuite de la seconde partie du travail d'assainissement, c'est-à-dire de la pasteurisation.

La pasteurisation a donc pour but de supprimer tous les accidents qui tiennent à la présence de mauvais ferments dans le lait. Pour être efficace elle doit être réalisée à une température au moins égale à 66°, agissant pendant une durée minima de 5 minutes. Le

lait refroidi, aussitôt à l'abri de l'air, est ensemencé de levains de ferments lactiques, mis en présure et soumis aux manipulations courantes que j'ai passées en revue.

Un chauffage à la température de 66°, maintenue pendant 5 minutes, est suffisant pour tuer tous les microbes nuisibles du lait, aussi bien les champignons que les bactéries capables de produire des accidents de fermentations ; mais il détruit en même temps les ferments lactiques ; il devient alors nécessaire de recourir à des levains de ferments lactiques pour assurer l'acidification du caillé, et comme l'évaluation pratique de la quantité de ferments rigoureusement nécessaire à une fabrication normale est une opération extrêmement facile, comme je l'ai montré p. 398, on voit que la pasteurisation du lait, qui est une mesure nécessaire si l'on veut bien asseoir la technique fromagère sur une base rationnelle, est aussi une manipulation simple.

La pasteurisation respecte cependant toutes les bactéries qui produisent des spores, car celles-ci résistent à une température supérieure à 100°, ces bactéries appartiennent au groupe des *b. subtilis* et à celui des *ferments butyriques*. Les uns et les autres sont ou détruits par l'acidité produite par les fermentations lactiques, ou tout au moins paralysés dans leur développement. Ils peuvent persister à l'état de spores inertes, et si on veut les isoler des fromages, il faut chauffer ce dernier à 100°, pendant 2 ou 3 minutes, ensemencer dans du lait stérilisé et neutre des fragments de matière gros comme un pois et attendre que les germes qui sont encore vivants puissent se multiplier. On constate ainsi que ces germes sont rares dans le lait pasteurisé.

Les *b. subtilis* et les *ferments butyriques* ne peuvent donc en aucun cas causer le moindre trouble dans les fermentations qui se déroulent dans le caillé.

Les ferments acidifiants, résistants, p. 401, survivent aussi à la pasteurisation ; les levains massifs de ferments lactiques, leur enlèvent toute influence, et dans les conditions ordinaires, leur nombre est si peu important et leur développement si lent, qu'ils passent inaperçus.

Ils sont pourtant plus résistants à l'acidité que les ferments lactiques eux-mêmes ; mais le degré auquel s'arrête l'acidification les condamne à l'inaction. Je dois d'ailleurs ajouter que ces ferments acidifiants n'altèrent en rien les qualités des fromages ; on les rencontre seuls dans les fromages qui exigent un temps assez long pour s'affiner, comme le port-du-salut et le pont-l'évêque véritable, car le ferment lactique y meurt au bout de quelques semaines, de sorte qu'on ne trouve plus dans le caillé que les ferments résistants.

La pasteurisation du lait en vue de la fabrication des fromages est en ce moment l'objet de recherches nombreuses dans tous les pays où l'industrie laitière constitue une source de revenus importants. Les résultats en sont plus ou moins satisfaisants. Des obser-

vateurs très consciencieux ont constaté, à la suite d'essais personnels, que cette opération ne semble pas être appelée à donner sitôt des résultats pratiques.

La raison de ces insuccès est facile à découvrir. Il s'est trouvé en effet des expérimentateurs qui ont eu l'idée de corriger par l'addition de chlorure de calcium, l'atténuation de l'activité de la présure, vis-à-vis du lait chauffé au-dessus de 65°. L'idée est originale et simple dans son application ; elle trouve sa justification dans la théorie d'Hammarsten, relative au mécanisme chimique de la coagulation de la caséine par la présure ; cette conception ramène le phénomène à une combinaison de caséine et de chaux, provoquée par la diastase. Mais on admet aujourd'hui que le rôle des sels de calcium est limité à leur fonction de substances coagulantes. Les acides agissent dans le même sens et on aurait pu, avec plus de raison à mon avis, réclamer à l'acide lactique le moyen de corriger la résistance acquise par le lait, à l'action de la présure, sous l'influence du chauffage. On aurait ainsi satisfait à une condition essentielle de la fabrication : l'acidité convenable du lait, et en même temps, on aurait imprimé aux fermentations du caillé acidifié, l'orientation nécessaire. Mais la théorie admet une précipitation partielle des sels de calcium du lait, sous l'influence du chauffage. C'est donc à cette perte qu'il fallait remédier suivant toutes les apparences. Cependant, là encore, il n'est pas démontré que la théorie ait vu juste.

J'ai établi avec la collaboration de MM. Guérault et Dinescu, qu'il existe une relation étroite entre la coagulation des albumines par la chaleur et l'atténuation de l'activité de la présure animale sur le lait ; c'est donc en somme dans la transformation du lait cru en lait cuit que la modification de l'activité de la présure animale doit puiser son origine, comme d'ailleurs la présure du figuier semble y trouver au contraire un surcroît d'activité.

Mais qu'on ait recours à l'addition de chlorure de calcium ou à l'acidification par l'acide lactique, les résultats ne peuvent présenter aucun intérêt pratique. Le caillé, je l'ai dit bien des fois au cours de ce travail, doit perdre sa consistance d'albumine cuite que lui donne la présure pour prendre l'état floconneux qui rend sa masse filtrante, et cela pendant l'égouttage même, afin, précisément, que cet égouttage s'accomplisse normalement.

Ni le chlorure de calcium ni l'acide lactique ne peuvent produire cette modification, qui est due uniquement à une fermentation acétique pure d'intensité convenable.

En négligeant d'ensemencer le lait pasteurisé d'un levain lactique on oublie, qu'on me passe l'expression, d'allumer sa lanterne. Il est nécessaire, en effet, de suivre dans cet ordre de recherches la méthode que j'ai détaillée ici, et l'on s'apercevra immédiatement que tout réussit au gré de l'opérateur s'il a, bien entendu, déterminé les constantes de la fabrication, et fixé le nombre et la nature des espèces

de ferments indispensables, toutes précautions que les praticiens qui ont utilisé les sels de calcium ont négligé de prendre.

Dans les applications à la fabrication en grand, M. Guérault a constaté que le caillé obtenu avec du lait pasteurisé accuse un léger déficit sur celui qui est fourni par le lait non traité. Cette remarque avait été faite également par M. Renard-Gillard. La différence n'est pas imputable à l'humidité du caillé puisqu'elle s'observe sur des fromages affinés. En étudiant la question de près au laboratoire, on a constaté que le chauffage solubilise une faible portion de matières azotées, tant que la température ne dépasse pas 65°. A 70°, la perte de rendement disparaît.

L'explication de ces résultats curieux est simple. Le chauffage solubilise la caséine mais dans une proportion très faible, qui va en croissant avec la température ; à partir de 65°, il coagule les albumines, et comme la quantité d'albumines coagulées croît plus vite que la quantité de caséine solubilisée, la compensation s'établit entre la perte de caillé par solubilisation et le gain par coagulation à la température de 67-68°, lorsqu'on opère sur du lait frais ; si le lait présente une légère acidité, la récupération du rendement se fait à une température moins élevée. C'est pour cette raison que nous avons conseillé d'adopter comme température de pasteurisation 67-68°, avec une tolérance de 1 à 2° en moins pour les laits acides à 2 gr. 2, 2 gr. 5, d'acide lactique par litre.

La pasteurisation du lait acide est possible tant que le taux d'acidité ne dépasse pas 3 grammes d'acide lactique par litre. L'acidité acquise avant la pasteurisation n'a plus d'influence sur l'égouttage ; le caillé qu'il donne sous l'action de la présure seule ne s'égoutte pas plus vite que celui que l'on obtient avec du lait frais supposé privé de microbes. Le lait acide pasteurisé supporte l'addition d'une quantité de levain plus forte que le lait non fermenté, car l'acidité acquise gêne le développement des ferments lactiques. Par contre, la présure doit être diminuée légèrement, car son action est augmentée dans un rapport proportionnel à l'accroissement de l'acidité. Il est donc possible de régler la coagulation et l'égouttage du lait acide aussi facilement que ceux du lait frais.

Mais, je le répète, des laits acides à 3 grammes d'acide lactique par litre ne devraient pas se rencontrer dans l'industrie.

Le lait contaminé peut donc se prêter à une fabrication régulière. La pasteurisation bien conduite ne modifie en rien l'action des divers agents, diastases et microbes auxquels le fromager fait appel au cours des diverses transformations qu'il provoque dans le lait ou le caillé.

Les fromages fabriqués avec du lait pasteurisé ne sont pas exposés aux divers accidents que j'ai décrits dans le chapitre V. Ils s'affinent lentement en raison de l'absence complète des ferments liquéfiant et des microbes producteurs d'ammoniaque ; leur durée de conserva-

tion est beaucoup plus longue ; leur saveur est plus douce que celle des fromages chargés d'ammoniaque.

Mais il ne faudrait pas en déduire que la contagion ne peut pas produire de mauvais effets sur les fromages ainsi fabriqués ; il est évident que cette méthode seule est capable de ramener la matière première aux conditions de pureté microbienne sans lesquelles les procédés industriels restent essentiellement changeants et instables, et par suite insuffisants et désordonnés.

Il est facile de prévoir que l'industrie des fromages à pâte molle va entrer dans une nouvelle phase ; la méthode rationnelle demandera pourtant le concours du temps pour s'imposer dans la pratique ; mais la lenteur de son évolution lui constitue une garantie de succès. La pasteurisation n'est qu'un moyen d'atteindre un but dont l'accès est difficile, car on ne peut l'assurer qu'à la condition de connaître les ferments, la manière de les conduire, leur mode d'action, et les services qu'on leur réclame.

Les fromagers de profession qui s'intéressent à leur métier se reconnaîtront aisément dans cet ensemble de faits et de notions que j'ai développés ; beaucoup ne leur attribueront pas l'importance qu'ils méritent parce qu'ils ont ce qu'on appelle leurs tours de mains, leurs secrets professionnels ; mais ceux-là ne tarderont pas à se rendre compte de ce fait que leurs secrets résident dans leur habileté à se placer dans les conditions que j'ai précisées. D'autres qui sont les plus nombreux ont besoin d'acquérir encore l'ensemble des connaissances pratiques qui constituent le bagage du bon technicien ; ils ont pris des habitudes contraires à leurs intérêts, et ils les conserveront longtemps parce qu'ils les justifient par des idées ou des opinions qui reposent sur des observations sans fondement.

A cette catégorie se rattachent les praticiens qui déclarent hautement que tel lait se prête à telle fabrication et qu'il en est ainsi parce qu'il en a toujours été ainsi. Par contre, les hommes de progrès et d'initiative cherchent et vérifient ; ils affirment sans détour qu'un résultat qui s'observe un jour, doit être reproduit à volonté si l'on veut bien se placer dans les mêmes conditions.

Pour eux, la réglementation de la fabrication est donc possible et ils la poursuivent sans relâche dès qu'ils ont constaté que les faits prévus se reproduisent chaque fois que leur déterminisme est réalisé.

Si je me permets de tenir ce langage, c'est parce que toutes les règles que j'ai établies dans le cours de cet exposé, procèdent directement de l'expérience industrielle. J'ai donné à l'industrie le temps d'analyser ces résultats et de les soumettre à une critique intéressée, d'affronter les conditions du marché. Ceux qui désirent se renseigner à la source, liront avec intérêt les rapports de M. Guérault, de M. Renard-Gillard, de M^{lle} de Villers aux congrès internationaux et nationaux d'industrie laitière ; d'autres industriels pourraient donner également une opinion motivée sur la question ; quelques-uns

ont été moins heureux parce qu'ils ne possédaient pas l'expérience suffisante pour maintenir les fermentations dans les limites d'action que leur assigne la nature des transformations à réaliser, parce qu'ils manquaient aussi, jusqu'à présent, de données précises et claires pour guider leurs efforts et de ceci je dois m'excuser en faisant mon *mea culpa*.

Si je me dérobe lorsqu'il s'agit de porter sur les résultats un jugement favorable (1), j'ai le devoir de répondre aux critiques qui ont été adressées aux fromages fabriqués avec du lait pasteurisé. Ces critiques sont justifiées par ce fait que lorsqu'on touche à la situation actuelle d'une industrie, il y a toujours des gens qui se croient menacés dans leurs intérêts. En réalité, il y a des déplacements d'influences économiques qui se font au profit des uns et au détriment des autres ; disons au profit des hommes d'initiative et de volonté, et cela est juste.

On a reproché par exemple, aux fromages pasteurisés, d'accuser une certaine résistance à l'affinage. Ils ont en effet les qualités de ce que les critiques appellent leurs défauts.

Ils ne renferment pas de ferments producteurs d'ammoniaque, ni de ferments de putréfaction, ni de ferments liquéfiant actifs ; rien d'étonnant alors à ce qu'ils s'affinent lentement, mais une fois affinés ils retrouvent leurs avantages, car ils peuvent se conserver plusieurs jours sans s'altérer.

(1) Pour être juste, et pour permettre à chacun de juger les résultats à leur valeur exacte, je donnerai ici les cours comparés des fromages fabriqués avec du lait pasteurisé par M. Renard-Gillard, et des fromages fermiers les plus renommés vendus les uns et les autres par MM. Baudoin, mandataires aux Halles, le 14 décembre 1909. M. Renard-Gillard a vendu ce jour 19 paniers de 10 Brie (moyen moule, 13 litres), au prix invariable de 48 fr. le panier.

Les cours obtenus par les Brie fermiers les plus recherchés (mêmes moules), présentent des variations. Je reproduis les cours minima et maxima, obtenus par chaque marque indiquée par ses initiales :

	Minimum	Maximum		Minimum	Maximum
B.	38.5	38.5			
R.	40	40	G.	32	33.5
C.	34	34	P.	34.5	35
D.	37	37	L.	39	40
V.	34	34.5	D.	40	40
S.	37	39	T.	36	37
R.	36	37	L.	36	36
R.	38	39	S.	30	33.5
L.	36	37.5	V.	33.5	34.5
R. L.	35	36	H.	36.5	38

Les meilleurs accusent donc une différence de 8 francs par panier avec ceux de M. Renard-Gillard, ce qui fait 0 fr. 80 par 13 litres de lait, en faveur des fromages fabriqués avec du lait pasteurisé.

Ces chiffres se passent de commentaires comme me l'écrivait M. Renard-Gillard ; ils ne constituent pas, bien entendu, une exception, un pareil écart est le résultat d'une préférence raisonnée qui traduit clairement l'opinion de celui qui paie, la seule intéressante en l'espèce.

On leur a reproché aussi une dureté trop grande ; c'est un défaut qu'ils peuvent acquérir ; je dirai même qu'ils ont une tendance à l'acquérir.

La conduite de l'égouttage par les procédés empiriques constitue pour les praticiens une source de difficultés énormes dont les imprévus atteignent les proportions d'une véritable obsession. Quand les fromagers se voient en possession d'une méthode qui permet de régler à volonté la vitesse de l'opération, ils ont une tendance à l'activer ; ils dépassent ainsi la limite permise, de sorte que le caillé retient trop peu d'eau pour faire face aux pertes provoquées par la suite, par l'évaporation au séchoir ou à la cave, en raison des habitudes contractées par les employés préposés aux soins à donner aux fromages.

Mais le principal obstacle à la généralisation rapide de la pasteurisation du lait, réside dans la difficulté d'entretenir les levains de ferments lactiques à l'état de pureté. L'industrie des fromages à pâte molle exige l'emploi d'un volume de levain, à 10 grammes d'acide lactique par litre, qui atteint en moyenne le 1/20 du volume de lait mis en œuvre ; le laboratoire ne peut donc pas fournir la quantité de ferments nécessaires à l'ensemencement du lait ; il doit se borner à préparer les semences ; le soin de préparer les levains de ferments lactiques revient à l'industriel. Le fermier y parvient tant bien que mal, plutôt bien, s'il veut se donner la peine de recueillir le lait avec soin et de le laisser s'acidifier dans des récipients où il est placé à l'abri de la contagion par les germes de l'air ; mais l'industriel ne reçoit que des laits fortement contaminés de sorte qu'il se trouve placé dans la nécessité de recourir à des préparations qui doivent être faites avec tous les soins qu'on apporte à ce genre de travail dans toutes les industries de fermentation.

Jusqu'ici on s'est contenté de préparer des levains dans des bidons ou des cuves ouvertes qu'on recouvre d'un couvercle mobile doublé de feuilles de papier ou d'un linge fin et serré pour mieux en défendre l'accès aux germes de l'air.

Ce procédé peut donner des résultats passables à force de soins ; mais comme l'ensemencement se fait par transvasement ou par prélèvement à l'aide d'une louche, il est impossible d'éviter les contaminations.

L'industrie fromagère, comme l'industrie beurrière, se trouve donc dans l'obligation de recourir aux cuves fermées stérilisables à la vapeur, pour préparer les levains de ferments lactiques purs.

Ces cuves sont mises en communication directe avec la sortie des pasteurisateurs ; le lait pasteurisé, refroidi à l'abri de l'air dans un réfrigérant récupérateur, se rend donc à la cuve à levain sans être exposé à la contamination (1).

(1) Quand l'appareil est installé dans une laiterie où la réfrigération du lait se fait à l'air libre, il est nécessaire de le munir de doubles parois pour permettre la pasteurisation et la réfrigération dans les cuves mêmes.

Deux cuves jumelles symétriques par rapport à l'arrivée du lait qui est distribué dans l'une ou l'autre au moyen d'un tube en T, fonctionnent à tour de rôle.

Supposons donc la cuve C (fig. 14), vide, stérilisée à la vapeur et refroidie ; on introduit la semence primitive par l'ouverture du tube à niveau, protégée par un chapeau métallique rempli de coton. Le

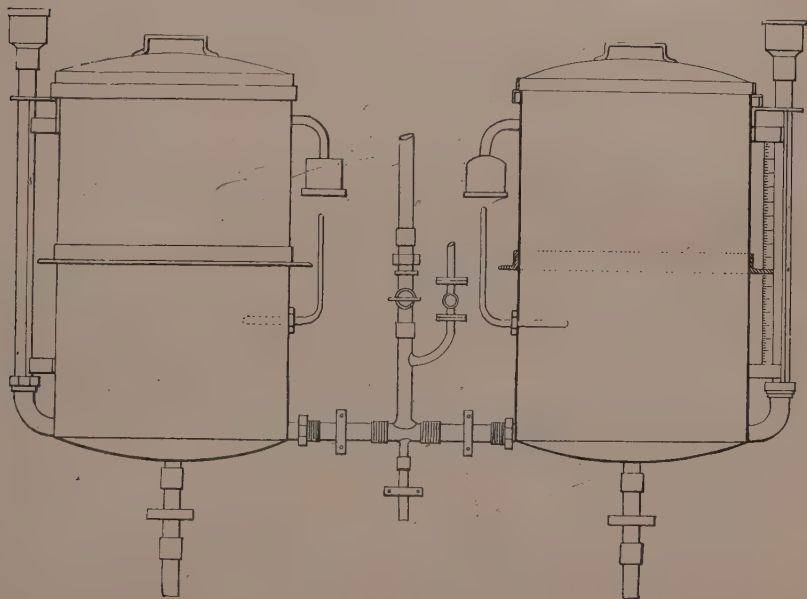


Fig. 14. — Cuve C à droite; au milieu, tube en T mettant en communication C et C' à gauche avec branchement pour l'admission de la vapeur qui sert à la stérilisation de l'appareil. Le tube de communication porte deux pinces P à droite, et P' à gauche. La vidange se fait par les tubes placés au bas des cuves, V à droite et V' à gauche.

lait qui arrive par le tube latéral T, entraîne la semence et assure ainsi sa répartition dans toute la masse du liquide. Au bout de 24 heures, la fermentation est suffisante. Il s'agit alors de procéder à la préparation du levain suivant. La cuve C' stérilisée à la vapeur et refroidie, reçoit une quantité suffisante, plutôt forte, environ 15 % du volume de lait employé, de semence empruntée à la cuve C : il suffit pour cela de desserrer la pince P ; le liquide s'écoule de lui-même dans la cuve C' ; l'abaissement du niveau N indique la quantité transvasée. On ferme la pince P ; la cuve C' est prête pour recevoir le lait pasteurisé ; quand elle en a reçu la quantité nécessaire, on ferme la pince P' ; le levain de la cuve C soutiré par le

tube de vidange V, peut alors être distribué dans le lait qu'il s'agit d'ensemencer. La cuve C est ensuite nettoyée ; le lendemain on la stérilise à la vapeur pour la faire entrer à son tour en fonction.

Ce dispositif ne laisse pas de prise à la contamination ; toutes les manipulations se font à l'abri des germes de l'air, dont l'intervention n'est possible qu'à la faveur d'une négligence ou d'une maladresse de l'opérateur. Pour plus de sécurité, j'ai supprimé tous les robinets et protégé les ouvertures qui permettent l'entrée où la sortie de l'air par des tampons de coton qui sont stérilisés tous les jours par la vapeur qui ne trouve devant elle aucune autre sortie.

Voilà donc un dispositif simple et pratique, qui fonctionne avec toute la sécurité des appareils de laboratoire les mieux appropriés au rôle qu'ils doivent remplir.

Il est facile à conduire, n'exige de l'opérateur aucune connaissance spéciale et ne nécessite pas d'interruption dans la pasteurisation.

Il complète l'outillage nécessaire à une industrie bien organisée en permettant de réaliser rigoureusement les conditions dictées par la théorie en tête desquelles se place la préparation des levains purs de ferments lactiques.

Les autres ferments indispensables à la fromagerie sont fournis à très peu de frais par le laboratoire, de sorte que les praticiens peuvent toujours s'en procurer des quantités suffisantes dans un état de pureté irréprochable

(A suivre.)

Recherches sur le sucre neutre des sucres bruts de canne.

PAR E. DUBOURG.

I

L'étude du sucre neutre des sucres bruts de canne a pour point de départ les observations de Mitscherlich (1) concernant la formation d'un sucre inactif obtenu en chauffant une solution très concentrée de sucre de canne vers 160°.

Les recherches de Soubeiran (2), Dubrunfant (3), Musculus (4), Maumené (5), Muntz (6), Aimé Girard et Laborde (7), Gayon (8) Horsin-Déon (9) complétèrent peu à peu les connaissances anciennes.

Ce fut M. Gayon qui établit la constitution de ce sucre formé, d'après lui, d'un sucre droit et d'un sucre gauche; mais il ne réussit pas à en déterminer la nature. Ce savant émit aussi l'opinion que ce sucre devait vraisemblablement sa formation dans les sucres bruts de canne, à la présence des divers microorganismes qu'on y trouve. Toutefois, il n'en fit pas la démonstration expérimentale.

Quand on provoque l'inversion du sucre de canne selon la méthode de Mitscherlich, il se forme en effet un sucre inactif, et

(1) MITSCHERLICH. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Berlin*, 1843.

(2) SOUBEIRAN. *Journal de Pharmacie*, 1843.

(3) DUBRUNFANT. *Annales de Chimie et de Physique*, 1847.

(4) MUSCULUS. *Annales de Chimie et de Physique*, 1865.

(5) MAUMENÉ. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1875.

(6) MUNTZ. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1876.

(7) AIMÉ GIRARD et LABORDE. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1876.

(8) M. GAYON. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences et Annales agronomiques*, 1878, 1879 et 1880.

(9) HORSIN-DÉON. *Bulletin de la Société chimique*, 1879.

on obtient des résultats semblables avec la méthode de Horsin-Déon; mais les recherches de Tauret (1) ont donné la solution définitive du problème par la découverte de sucres tautomères à pouvoir rotatoire variable, selon les conditions d'expérience.

On avait déduit de tous les travaux précédemment parus, que le réducteur formé dans les sucres bruts de canne est neutre comme s'étant formé dans des conditions se rapprochant de celles réalisées par les divers savants qui avaient abordé l'étude du sucre inactif. Si bien que dans toutes les analyses de ces sucres bruts, on considère encore aujourd'hui la rotation observée comme appartenant exclusivement au saccharose; on recommande l'inversion Clerget seulement lorsque la proportion de réducteur s'élève à 50/0.

Et cependant Duclaux, au 4^e volume de sa microbiologie, écrivait, page 128 :

« On désigne sous le nom de sucre neutre, un sucre formé par un mélange de glucose et de lévulose, dont les pouvoirs rotatoires égaux et de sens inverse s'annulent exactement. *On ne sait pas bien ce que sont ces sucres.*

Par l'exposé des expériences qui suivent, j'espère démontrer que ce sucre neutre n'existe pas; c'est du sucre interverti.

II

Afin d'opérer sur une assez grande quantité, pesons 40 gr. 72 de sucre raffiné (2 fois et demie le poids normal), introduisons dans un flacon et faisons de même dans une série de flacons avec des doses croissantes d'eau thymolisée. Dans chacune des fioles, ajoutons enfin de l'eau de levure préparée avec une levure desséchée d'abord dans le vide, puis portée à 420° pendant une heure, pulvérisée et reprise par de l'eau thymolisée, puis filtrée.

Laissons un mois à la température du laboratoire (25° environ), faisons dissoudre la masse sucrée dans une fiole de 250 c. c.; l'analyse donne les chiffres du tableau I.

L'inspection des chiffres de ce tableau montre que les numéros 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 paraissent contenir du sucre neutre, puisque les différences entre les rotations observées et calculées sont nulles ou très faibles. Mais, il est digne de remarque que la rotation, après l'inversion, reste partout la même; or, dans

(1) TAURET. *Bulletin de la Société chimique*, 3^e série. Volumes 13 et 15.

TABLEAU I

NUMÉROS D'ORDRE	EAU DE LEVURE	EAU THYMOLISÉE	HUMIDITÉ TOTALE dans 100 de sucre.	ROTATION DIRECTE	ROTATION après inversion.	ROTATION calculée.	DIFFÉRENCES	RÉDUCTEUR avant inversion.	RÉDUCTEUR total.
1	0 c. c. 50	0 c. c. 50	2,44	98,70	32,5	98,70	0	1,32	104,80
2	id.	1 c. c. 50	4,88	98,00	32,3	98,00	0	1,62	id.
3	id.	2 c. c. 50	7,32	97,10	32,4	97,10	0	2,57	id.
4	id.	3 c. c. 50	9,76	96,20	32,5	95,90	- 0,3	3,35	id.
5	id.	4 c. c. 50	12,20	92,80	32,6	93,80	+ 1,0	6,12	id.
6	1 c. c.	0	2,44	98,00	32,4	98,05	0	1,59	id.
7	id.	1 c. c.	4,88	96,90	32,2	96,90	0	2,83	id.
8	id.	2 c. c.	7,32	95,80	32,4	96,10	+ 0,3	3,68	id.
9	id.	3 c. c.	9,76	90,00	32,5	92,30	+ 2,3	7,62	id.
10	id.	4 c. c.	12,20	86,00	32,6	87,90	+ 1,9	12,25	id.

l'hypothèse d'un sucre neutre, cette rotation totale devrait diminuer, c'est-à-dire remonter vers la droite.

L'expérience poursuivie jusqu'au troisième mois, avec des masses sucrées préparées dans les mêmes conditions, fournit les résultats du tableau II.

On observe des résultats concordants, avec cette différence que la formation d'inverti apparaît nettement au n° 4.

Si on place, en même temps, des témoins avec de l'eau thymolisée seule, sans addition d'eau de levure, il n'y a, à aucun moment, formation de réducteur, même avec 12 0/0 d'humidité, la rotation ne varie pas.

Un essai comparatif avec de l'eau distillée *non thymolisée* permet de constater au contraire la formation de réducteur; les masses sucrées sont envahies par des microorganismes divers visibles au microscope et révélés aussi par desensemencements dans des liquides nutritifs préalablement stérilisés. C'est la démonstration du fait entrevu par M. Gayon que nous retrouverons du reste plus loin.

TABLEAU II

NUMÉROS D'ORDRE	ROTATION observée.	RÉDUCTEUR	ROTATION après inversion	RÉDUCTEUR total.	ROTATION calculée.	DIFFÉRENCES
1	96,20	3,47	— 32,5	104,80	96,10	— 0,1
2	94,80	4,19	— 32,4	id.	95,40	+ 0,6
3	93,40	5,42	— 32,4	id.	94,20	+ 0,8
4	90,20	8,78	— 32,4	id.	91,50	+ 1,0
5	86,00	11,52	— 32,3	id.	88,40	+ 2,4
6	92,80	5,68	— 32,4	id.	94,00	+ 2,8
7	91,00	7,68	— 32,2	id.	92,10	+ 2,1
8	86,00	12,05	— 32,2	id.	87,90	+ 1,9
9	80,80	15,68	— 32,3	id.	83,50	+ 2,7
10	60,20	36,20	— 32,4	id.	65,00	+ 4,8

On a répété l'expérience du tableau I en substituant à l'eau de levure filtrée, des cultures d'*Aspergillus niger* préparées selon la méthode de Fernbach pour la concentration des diastases; enfin des essais faits avec des cultures de deux microbes lactiques, retirés de sucres bruts, ont toujours fourni des résultats de même nature. L'inverti s'est accusé dans les solutions, seulement aux environs de 30/0 de sucre réducteur.

III

Les recherches qui précèdent semblent donc indiquer qu'il se forme du sucre neutre au début de la transformation du sucre de canne et que l'inverti apparaît lorsque la proportion de ce réducteur atteint environ 30/0.

J'ai fait remarquer plus haut que cependant la rotation totale reste invariable dans tous les cas.

Si au lieu de calculer la proportion du réducteur rapportée à 100 grammes de sucre, on en considère les quantités

réelles existant dans les solutions elles-mêmes, on voit que 3 0/0 de réducteur, correspondent, en réalité, à 0 gr., 48 environ dans la dissolution, quand on a dissous 16 gr., 29 (poids normal) dans une fiole de 100 c. c. Or, cette proportion de réducteur, envisagée comme de l'inverti, correspond à peine à 0^o75 saccharimétriques. On comprend dès lors que les chiffres observés paraissent concorder avec les chiffres calculés, surtout lorsque la proportion de réducteur s'abaisse au-dessous de 3 0/0.

Voici du reste un exemple de l'influence de ce réducteur sur la rotation.

A une série de fioles de 100 c. c. contenant le même volume d'une même solution de saccharose, on ajoute des doses croissantes de sucre interverti préalablement préparé avec une culture d'*Aspergillus Niger*. Ces doses sont telles qu'elles correspondent aux teneurs indiquées ci-après, rapportées à 100 grammes de saccharose. Après avoir complété partout le volume de 100 c. c. on observe au saccharimètre et on constate :

INVERTI 0/0	ROTATION OBSERVÉE	DIFFÉRENCE
0	96,0	»
1	96,0	0
1,5	93,0	0
2,0	96,1	+ 0,1
2,5	93,8	— 0,2
3,0	93,7	— 0,3
4,0	93,1	— 0,9
8,0	94,0	— 2,0
10,0	93,4	— 2,6

C'est encore à partir d'environ 3 0/0 de réducteur que la rotation varie sensiblement.

Et l'expérience qui précède fournit les mêmes résultats quand on modifie les concentrations de saccharose, aussi bien à 25 qu'à 80 0/0.

| L'erreur toujours commise dans l'interprétation des analyses de sucre provient donc de la trop faible proportion de réducteur contenue, en fait, dans les dissolutions.

V

Reprenons les chiffres du premier tableau, 104^{gr},80 0/0 de réducteur correspondent à 17^{gr},08 dans la solution. Le calcul des proportions respectives de glucose et de lévulose donne le

rapport glucose-lévulose = 1.00, c'est-à-dire celui du sucre interverti. Et ce rapport ne varie pas, quelle que soit la proportion du réducteur formé, puisque la rotation totale et le réducteur total restent constants.

Il est utile de remarquer que les erreurs de lecture, après l'inversion, peuvent atteindre un demi degré, que le pouvoir rotatoire du sucre interverti est influencé notablement par la température, et qu'enfin ce pouvoir rotatoire lui-même n'est pas tout à fait bien fixé dans la science. Pour toutes ces raisons, il est aisé de comprendre combien la détermination rigoureuse des divers éléments constitutants des sucres est difficile, lorsqu'il s'agit de préciser la nature de l'un des composants contenu en faibles proportions dans les solutions étudiées.

VI

Quand on reprend l'expérience du premier tableau avec des sucres bruts de canne, on constate des résultats identiques, mais à la condition expresse d'introduire de l'eau thymolisée pour éviter l'action des microorganismes présents dans ces sucres et dont nous étudierons plus loin les influences.

On peut, de la manière suivante, mettre en évidence la présence d'inverti dans un sucre brut.

Le sucre suivant donne à l'analyse :

Rotation directe...	93. 00
Rotation après inversion...	33. 00
Rotation calculée...	93. 40
Réducteur...	3. 38
Réduction totale...	101. 40

En apparence le réducteur est du sucre neutre; mais en fait, il y a 16^{gr},41 de sucre total dans la solution et le calcul donne comme rapport glucose-lévulose = 0,99.

En outre, je lave environ 500 grammes du même sucre avec de l'alcool méthylique afin d'obtenir un enrichissement en réducteur, j'évapore à basse température et j'obtiens, après reprise par l'eau, une solution donnant les chiffres suivants (1) :

(1) Il y avait dans la liqueur avant l'inversion 5 gr., 82 0/0 de saccharose entraîné, mais cette faible proportion n'est pas de nature à altérer les résultats.

ROTATION
après inversion

39°5

RÉDUCTEUR

21,96 0/0

GLUCOSE
LÉVULOSE

4,01

C'est bien du sucre interverti, et cependant les chiffres de la première analyse avaient permis de supposer que le réducteur contenu dans ce sucre était inactif.

Le danger des méthodes analytiques admises provient surtout de l'influence considérable de la lecture au saccharimètre après l'inversion, dont j'ai déjà fait remarquer les incertitudes.

S'il n'y a pas de sucre neutre dans les sucres bruts de canne, il semble qu'une modification, dans les méthodes analytiques ordinaires, doive être adoptée; l'inversion Clerget s'impose lorsque le réducteur atteint le chiffre de 3 0/0.

Mais encore, il est des cas où de nouvelles difficultés apparaissent, elles proviennent d'altérations dans la constitution elle-même du sucre interverti formé.

Voici un tableau (III) où sont répétées les premières expériences, mais avec un sucre brut et avec addition d'eau *non* thymolisée pour ne pas paralyser les microorganismes.

TABLEAU III.

	NUMÉROS D'ORDRE	HUMIDITÉ dans 100 grammes.	ROTATION DIRECTE	ROTATION après inversion.	ROTATION calculée.	DIFFÉRENCES	RÉDUCTEUR avant inversion.	RÉDUCTEUR après inversion.
2 mois à la température du laboratoire (25°).	1	2,25	90,20	30,00	89,40	— 0,90	3,69	97 80
	2	5,00	90,00	35,20	86,40	— 3,60	4,65	95,60
	3	8,00	86,80	35,10	85,30	— 1,50	5,90	95,30
	4	12,00	85,00	36,20	83,90	— 2,90	7,30	95,10
2 mois à l'étuve (35°).	1	2,25	90,00	30,00	89,10	— 0,90	4,20	98,00
	2	5,00	82,00	30,00	81,00	— 1,00	9,20	94 40
	3	8,00	75,50	27,00	76,00	+ 0,50	13,95	94,40
	4	12,00	60,50	24,00	66,40	+ 5,90	20,15	90,00

Dès le début l'inverti apparaît; il est vrai que la proportion de réducteur dépasse 30 %. L'excès de rotation gauche s'accuse comme au deuxième tableau, mais la rotation totale a notablement diminué, indiquant tantôt un excès de sucre droit, tantôt un excès de sucre gauche. En même temps, le sucre total a sensiblement diminué, lui aussi.

Nous avons démontré, il y a longtemps, M. Gayon et moi (1) des phénomènes de même nature et nous avons isolé, dans des sucres bruts, diverses espèces de levures, les unes faisant fermenter le glucose plus rapidement que le lévulose, d'autres jouissant de la propriété inverse.

Suivant que l'une d'elles dominera dans un sucre on aura tantôt excès de rotation droite, tantôt excès de rotation gauche; d'autres fois, leurs actions réciproques pourront se neutraliser.

On peut mettre en évidence le rôle respectif de ces levures, dans des sucres bruts, par une expérience directe.

Dans une série de fioles de 100 c. c., on introduit 16 gr. 29 de sucre brut préalablement porté à 110° pour détruire les germes qu'il pouvait contenir; on ajoute ensuite une émulsion de la levure considérée.

La première série est mise en train avec une levure faisant fermenter le glucose plus vite que le lévulose; la seconde série, avec une levure produisant le phénomène inverse, on observe après avoir abandonné les fioles à la température du laboratoire pendant 2 mois, et on trouve :

Première série

NUMÉROS D'ORDRE	ÉMULSION	ROTATION directe	RÉDUCTEUR avant inversion	RÉDUCTEUR après inversion	ROTATION calculée	DIFFÉRENCES
1	0 c.c. 50	86,60	4,98	96,60	87,04	+ 0,44
2	1 c.c. 00	85,35	4,83	95,45	86,12	+ 0,97
3	1 c.c. 50	84,40	5,06	95,33	85,70	+ 1,30

Deuxième série

1	0 c.c. 50	87,85	4,95	97,15	87,60	— 0,25
2	1 c.c. 00	87,45	4,98	96,45	86,90	— 0,55
3	1 c.c. 50	87,45	5,32	96,20	86,38	— 1,07

(1) GAYON et DUBOURG. Fermentation du sucre interverti. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1889.

On le voit, la lecture directe peut entraîner des erreurs dépassant un degré, et il est intéressant de remarquer que si une certaine quantité du saccharose a été transformée en réducteur, la richesse saccharine totale a diminué; il y a en effet fermentation : il est facile de s'en assurer en vérifiant la présence d'alcool. Cela ne saurait surprendre, car il a été rencontré des levures provoquant des fermentations alcooliques dans des solutions nutritives contenant 80 0/0 de sucre interverti (1).

Sans doute le sucre mis en œuvre est assez impur, mais je l'ai choisi à dessein pour que l'essai fut plus démonstratif. Je pourrais cependant exposer des expériences dans lesquelles se révèlent les mêmes perturbations avec des sucres ne contenant pas plus de 3 0/0 de réducteur au départ. Il suffit qu'il y ait de l'humidité et de l'azote pour que les levures puissent se développer dans un pareil milieu, malgré la concentration saccharine.

Les résultats de cette étude servent à expliquer les divergences susceptibles d'être observées dans les analyses des sucres bruts de canne, lorsqu'elles sont répétées après un certain temps. En fait, cette anomalie s'est présentée souvent.

En terminant ce travail, je me crois donc autorisé à conclure que le sucre neutre des sucres bruts de canne est inexistant, et que le sucre interverti qu'on y rencontre ne conserve pas une constitution normale constante.

Je me réserve d'apporter, dans une étude ultérieure, des faits intéressants concernant la nature et la constitution des sucres contenus dans les mélasses de canne.

(1) E. DUBOURG. *Revue de Viticulture*, 1897.

Sérodiagnostic et variabilité des microbes suivant le milieu de culture

PAR LES D^{rs} J. BORDET, *directeur*, et SLEESWYK, *membre étranger*
de l'Institut Pasteur de Bruxelles.

Pour que le diagnostic des microbes par les sérums donne des indications précises et toujours infaillibles, il faut évidemment que la spécificité des sérums soit assez stricte, assez délicate pour mettre en évidence les différences de constitution chimique qui séparent les espèces bactériennes, mais il faut aussi qu'à travers les vicissitudes qu'elles rencontrent soit dans la nature, soit au laboratoire, ces espèces gardent chacune, comme une empreinte ineffaçable, le pouvoir de réagir avec le sérum approprié.

Ces deux conditions sont souvent réalisées d'une manière satisfaisante; s'il en était autrement, d'ailleurs, le sérodiagnostic n'aurait pu rendre les précieux services dont on lui est redevable. Mais on sait qu'elles ne le sont point toujours d'une manière absolue. Tel immunsérum actif vis-à-vis d'un microbe donné peut réagir, à un degré en général beaucoup moindre il est vrai, avec un autre microbe : les frontières entre les espèces microbiennes sont parfois indécises, il peut exister entre celles-ci des points de contact, où les caractères tendent à se fusionner. Les espèces animales donnent lieu à une remarque analogue; un sérum précipitant le sérum de poule, par exemple, précipite aussi, mais plus faiblement, le sérum de pigeon (1). D'autre part, les propriétés d'une espèce microbienne déterminée ne restent pas toujours, au point de vue de la réaction avec l'immunsérum approprié, absolument identiques à elles-mêmes, quelles que soient les condi-

(1) BORDET. *Ces Annales*, 1899.

tions de vie. Metchnikoff et l'un de nous ont vu, il y a bien longtemps, que le vibrion cholérique peut perdre partiellement, dans certaines circonstances, son agglutinabilité (1); des faits analogues ont été signalés par Bail à propos du bacille typhique; Nicolle et Trenel (2), Kirstein (3), opérant sur le prodigiosus ou le typhique, ont obtenu, par culture à certaines températures, des races microbiennes peu agglutinables. Les microbes entretenus au laboratoire se modifient parfois quant à l'aptitude à réagir avec le sérum spécifique. En étudiant le charbon bactérien, Grassberger et Schattenfroh (4) ont apporté à ce propos des renseignements très intéressants. Des souches de bacilles typhiques, provenant de malades différents, ne se comportent pas exactement de même; Friedberger (5) a étudié très soigneusement, dans cet ordre d'idées, un échantillon de bacille d'Éberth, isolé par Preiss d'un cas grave de fièvre typhoïde; ce microbe, mis en contact avec du sérum antityphique de cheval, n'en absorbait l'agglutinine que fort incomplètement et ne se montrait corrélativement que peu agglutinable. Muller a fait des recherches dans le même sens. A ce même point de vue de l'influence du sérum, le bacille dysentérique a été l'objet de nombreuses observations, dues notamment à Dopter, Park, Collins et Goodwin, Gay, Ruffer et Wilmore.

Lorsqu'un microbe ne se comporte plus de même vis-à-vis de l'immunsérum, à quelle modification doit-on attribuer le changement observé? Plusieurs hypothèses peuvent *a priori* être formulées. Les microbes, on le sait, absorbent les substances actives des sérums, et il convient, pour la commodité du langage, d'appeler récepteurs les substances microbiennes, d'ailleurs mal connues, qui s'unissent aux anticorps. Dès lors, lorsqu'un microbe ne réagit plus ou réagit moins bien avec l'immunsérum, on peut supposer tout d'abord qu'il a perdu, totalement ou partiellement, le pouvoir d'élaborer les récepteurs indispensables. On pourrait aussi concevoir que les récepteurs n'ont pas disparu, mais qu'une influence antagoniste s'est développée, qui s'oppose à leur union

(1) Mode d'action des sérums préventifs. Ces *Annales*, 1896.

(2) Ces *Annales*, 1902.

(3) *Zeitschrift für Hygiene*, 1904. Bd 46.

(4) Sitzungsberichten der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien; mathem. naturw. Klasse, 1905.

(5) *Salkowski Festschrift*.

avec l'anticorps (1). Ces hypothèses impliquent toutes deux le même fait, à savoir que le microbe ne s'empare plus des substances actives du sérum. Mais on peut imaginer encore que, tout en ayant gardé la faculté d'absorber les anticorps grâce aux récepteurs caractéristiques, le microbe ait acquis, par une sorte d'adaptation, la propriété de se montrer réfractaire aux effets de cette combinaison, de ne plus présenter les phénomènes que le sérum provoque habituellement. Par exemple, il n'est pas impossible qu'un microbe devienne inagglutinable, tout en fixant comme auparavant l'agglutinine. Pour ce qui concerne notamment les virus que des passages à travers l'organisme ont rendus plus dangereux, on inclinerait à considérer cette dernière hypothèse comme plausible, car elle évoque l'idée d'un perfectionnement survenu chez le microbe, d'une modification défensive, capable de le soustraire à une influence déprimante, sans lui enlever néanmoins ses caractères spécifiques.

Que des races microbiennes, appartenant sûrement toutes à la même espèce, ne soient pas absolument identiques au point de vue des récepteurs, cela résulte clairement de certains travaux cités plus haut, notamment de ceux de Friedberger, Ruffer et Wilmore, lesquels, à vrai dire, se rapportent à des variétés créées non par l'expérimentateur, mais par la nature. En effet, les diverses races étudiées n'absorbent pas avec la même énergie la même agglutinine. Ce qui est vrai des récepteurs l'est aussi des antigènes; au surplus, peut-être les antigènes ne sont-ils pas autre chose que les récepteurs, cette question est bien difficile à trancher dans l'état actuel des connaissances. Ce qui est certain, c'est que, généralement, un immunsérum donné agit plus puissamment sur la race qui a servi à l'obtenir, que sur d'autres races appartenant à la même espèce.

Les variations observées par Grassberger et Schattenfroh, qui opéraient sur le charbon symptomatique, peuvent être qualifiées d'expérimentales, en ce sens qu'elles se manifestaient

(1) De nombreux faits, que les recherches sur l'adhésion moléculaire ont mis en évidence, permettent de concevoir cette possibilité. Le sulfate de baryte en suspension s'empare avidement de la mucine; il fonctionne donc comme récepteur vis-à-vis de cette substance. Mais il suffit d'ajouter une trace de citrate de soude pour que l'absorption de mucine ne se produise pas (GENGOU, *Bull. de l'Acad. de Médecine de Belgique*, 1908). Dans cet exemple, le récepteur est encore présent, mais il est mis dans l'impossibilité d'agir.

à la suite de la culture au laboratoire. Un sérum obtenu par l'injection de sérosité virulente agglutine les microbes qui pullulent dans cette sérosité, mais non les microbes habitués aux milieux de culture artificiels. Seulement, en quoi ces derniers microbes se distinguent-ils des premiers? Certains récepteurs ont-ils réellement disparu, ou bien, malgré leur présence, les microbes sont-ils devenus, en raison d'un changement d'un autre ordre, moins aptes à subir la floculation, moins sensibles par exemple à l'influence des électrolytes qui, nous le savons, interviennent nécessairement dans l'agglutination? Cette question n'a pas été élucidée, Grassberger et Schattenfroh n'ayant pas, à notre connaissance, réalisé d'expériences d'absorption analogues à celles que les auteurs précédemment cités ont instituées à propos des races, fournies par la nature, de bacille typhique ou de bacille de la dysenterie. La nature peut modifier réellement les récepteurs, exercer en d'autres termes une influence profonde sur le phénomène initial dont les autres manifestations de l'activité des sérums dépendent, la combinaison avec l'anticorps. Celle-ci parfois ne s'opère plus. S'agit-il vraiment alors d'une disparition du récepteur, ou bien une influence secondaire intervient-elle pour l'empêcher d'entrer en réaction? Nous ne chercherons pas, pour le moment, à pénétrer aussi profondément dans l'intimité de la cause. Quoi qu'il en soit, d'ailleurs, tout se passe, dans de semblables cas, comme si le récepteur n'existait plus. Quand nous dirons, au cours de cet article, qu'un microbe a perdu son récepteur, cela voudra dire simplement qu'il n'absorbe plus l'anticorps. Au surplus, la question essentielle que nous nous sommes posée est la suivante : Ce que la nature réalise, les conditions d'alimentation auxquelles nous soumettons les microbes peuvent-elles l'effectuer aussi? Pouvons-nous, à notre gré, faire apparaître ou disparaître certains récepteurs? La réponse à cette question sera affirmative. On peut, en changeant le milieu nutritif, créer, en partant d'un seul et même échantillon microbien, des races que le sérodiagnostic par l'agglutination distingue, qui ne s'unissent pas avec les mêmes anticorps, et dont l'injection aux animaux permet d'obtenir des immunsérums différents.

Nos recherches ont porté sur le microbe de la coqueluche, lequel est fort approprié à l'étude qui nous intéresse. Étant assez exigeant quant à son alimentation, il ne parvient à pousser sur certains milieux (trop différents de ceux qu'il rencontre dans l'organisme) qu'aux prix de réels efforts. Et c'est précisément sans doute parce qu'il doit accomplir un effort qu'il met en jeu sa plasticité physiologique, sa souplesse d'adaptation, qu'il subit des modifications allant jusqu'à se répercuter sur la constitution des récepteurs.

Nous cultivons habituellement le microbe de la coqueluche sur un substrat très riche en sang défibriné, préparé comme Bordet et Gengou l'ont indiqué dans leurs *Mémoires sur la Coqueluche* (1); mais on peut, comme Klimenko (2) l'a constaté de son côté, l'habituer à pousser sur de la gélose ordinaire. On obtient facilement de telles cultures en ensemençant successivement le microbe sur des géloses de moins en moins riches en sang. On peut arriver au même résultat en ensemençant sans transition, mais alors très abondamment, les microbes provenant du milieu riche en sang sur de la gélose ordinaire, ne contenant aucune trace de sang ou de sérum. On observe dans ces conditions un phénomène assez remarquable. Pendant une semaine environ, parfois davantage, la géloseensemencée n'est le siège d'aucune multiplication; dans la suite, une mince couche blanchâtre apparaît, qui s'épaissit graduellement. Donc, le microbe consacre un laps de temps assez prolongé à s'adapter aux nouvelles conditions d'existence. Lors des repiquages ultérieurs, le microbe pousse plus aisément; la multiplication toutefois n'est jamais très rapide; la couche microbienne obtenue après 5 à 6 jours est épaisse, visqueuse, assez adhérente à la surface nutritive. Délayée dans la solution physiologique, elle donne une émulsion plus blanche que celle du microbe développé sur le milieu riche en sang défibriné; celle-ci est plus bleuâtre, son aspect est très homogène, presque colloïdal. Quant à la morphologie, elle ne subit guère de changement. Pour la commodité du langage, désignons les deux races ainsi obtenues, celle qu'on maintient constamment sur milieu riche en sang, celle qu'on cultive sur gélose ordinaire, sous les noms de microbe-sang (MS) et de microbe-gélose (MG.) Disons un fois pour toutes que

(1) Ces *Annales*, 1906 et 1907.

(2) *Centralblatt f. Bakter. Orig.* Bd. XLVIII, 1908.

tous les sérums étudiés au point de vue agglutinant ou sensibilisateur ont été chauffés à 56°.

Pour commencer, éprouvons sur ces deux microbes le sérum d'un cheval fortement immunisé contre le microbe (MS) qui depuis l'origine, a toujours été cultivé sur le milieu au sang (1).

On a ensemencé, en strie assez large, sur la surface du milieu gélose-sang distribué en tubes de dimensions moyennes, le microbe MS. Après 2 ou 3 jours d'étuve, on enlève avec une fine baguette de verre toute la couche microbienne, qu'on délaie dans 3 c. c. de solution physiologique de NaCl 0,9 0/0; on obtient ainsi une émulsion bien trouble. D'autre part, on prépare une émulsion au moins aussi dense de l'autre microbe (MG) développé sur gélose ordinaire (2).

Le sérum de cheval non immunisé possédant déjà un certain pouvoir agglutinant, il convient, pour étudier spécialement l'immunsérum, de le faire intervenir à dose faible; l'influence des anticorps normaux est négligeable à de fortes dilutions. Dans ces conditions, nous trouvons que l'immunsérum de cheval agglutine avec une extrême énergie le MS, mais qu'il est inactif à l'égard du MG. Donc, le microbe coquelucheux, soumis à un changement d'alimentation, c'est-à-dire transporté, depuis quelques générations, d'un milieu riche en sang sur un milieu (gélose ordinaire) qui n'en contient pas, perd la faculté de s'agglutiner sous l'influence du sérum obtenu par immunisation contre le microbe développé sur le substrat au sang. Il est facile de démontrer que le MG ne possède pas les récepteurs nécessaires à l'absorption de l'agglutinine spécifique :

Dans un tube A on verse 1,4 c. c. d'émulsion MG; dans un tube B, même dose d'émulsion MS; dans un tube C, 1,4 c. c. de solution physiologique. On ajoute à chacun des trois tubes 0,1 c. c. de solution physiologique contenant 1/300 de c. c. d'immunsérum. Le tube B montre, après quelques minutes, une forte agglutination; pas d'agglutination dans le tube A. Quatre heures plus tard, on centrifuge énergiquement. On décante les liquides surnageants

(1) Les émulsions obtenues par délayage de la couche microbienne contenant forcément des traces des matériaux nutritifs du milieu de culture, il va de soi que les milieux solides employés pour les cultures destinées au cheval étaient préparés avec du sang de cheval. Il fallait éviter de se servir d'un sang différent, dont la présence dans l'émulsion aurait provoqué chez l'animal l'apparition d'anticorps hémolytiques ou précipitants. Une remarque analogue concerne l'immunsérum dont il sera question plus loin, et qui provenait de lapin; dans ce cas, on a, bien entendu, employé des cultures développées sur gélose-sang de lapin.

(2) Les émulsions employées dans les expériences ultérieures seront toujours préparées de la même façon.

A et B, qui sont bien limpides (1). On éprouve leur pouvoir agglutinant et celui du liquide témoin C, sur les émulsions microbiennes. Chacun des liquides A, B, C, est réparti, à la dose de 0,5 c. c. dans deux tubes; l'un de ceux-ci est additionné de 0,3 c. c. d'émulsion MG, l'autre, de même quantité d'émulsion MS. Voici les résultats :

ÉMULSION (0,3 c. c.)	IMMUNSÉRUM TRAITÉ AU PRÉALABLE		IMMUNSÉRUM Intact (llq. C).
	Par MG (llq. A).	Par MS (llq. B).	
MG	0	0	0
MS	+	0	+

L'immunsérum, traité par MG, renferme donc encore l'agglutinine active sur MS. Cet anticorps spécifique n'a été aucunement absorbé; en effet, MS s'agglutine exactement aussi vite (en quelques minutes) et aussi fortement dans cet immunsérum traité que dans le liquide C, c'est-à-dire que dans le sérum simplement dilué. Bien entendu, MS ne s'agglutine pas dans B, traité au préalable par MS.

Employé en quantité beaucoup plus forte, l'immunsérum agglutine nettement MG, mais il faut remarquer qu'à de telles doses le sérum de cheval neuf produit un effet analogue, à peu près aussi accusé. Quand on mélange 1,4 c. c. d'émulsion de MG non plus avec 1/300 de c. c., comme on le faisait dans l'expérience précédente, mais avec 1/50 de c. c. d'immunsérum, on obtient une agglutination assez perceptible. Si l'on centrifuge ensuite et décante, on constate que le liquide surnageant n'agglutine plus de nouvelle émulsion MG, tout en ayant conservé dans son intégrité, comme nous l'avons vu plus haut, le pouvoir agglutinant spécifique et si intense qui s'exerce vis-à-vis de MS. L'agglutinine impressionnant MG, et qui n'agit qu'à dose assez élevée, est vraisemblablement un anticorps normal, préexistant à l'immunisation. Nous sommes en présence de deux anticorps foncièrement différents selon toute probabilité, puisque l'un (existant déjà avant l'immunisation) est fixé par MG, tandis que l'autre (dû au traitement immunisant) ne l'est pas.

(1) Étant immobiles, les microbes coquelucheux se sédimentent très bien par centrifugation, même lorsqu'ils ne sont pas agglutinés.

Cette notion résulte avec évidence de l'étude du sérum normal de cheval. Si l'agglutinine propre à l'immunsérum (celle qui impressionne si puissamment MS, et que MG n'absorbe pas) était identique à celle que le sérum normal contient déjà, on devrait s'attendre à ce que MS, infiniment plus sensible à l'immunsérum, soit également plus vivement agglutiné par le sérum normal, que ne l'est MG. Or, c'est le contraire qu'on observe : lorsqu'à 1,4 c. c. d'émulsion, d'une part de MG, d'autre part de MS, on ajoute 0,1 c. c. de sérum de cheval neuf, on constate qu'au bout de 3 heures une forte agglutination est survenue dans MG; MS n'a pas changé. Si l'on emploie une dose double de sérum, MS ne montre qu'une agglutination lente et légère, tandis qu'après 15 minutes MG présente déjà des flocons; il s'agglutine bientôt complètement. Donc l'agglutinine du sérum neuf, qui impressionne assez fortement MG, n'est pas identique à l'agglutinine, si spécifiquement appropriée à MS, de l'immunsérum.

Mais nous venons de signaler qu'à dose vraiment élevée, le sérum normal agglutine non seulement MG, mais aussi, quoique beaucoup plus faiblement, MS. En réalité, les deux microbes sont sensibles au sérum neuf, ils le sont très inégalement. Dès lors, il faut se demander si c'est par l'intermédiaire d'un seul et même anticorps normal que le sérum neuf agit sur les deux variétés microbiennes. On conçoit l'intérêt de cette question. Si la réponse qu'elle comporte était positive, si l'agglutinine normale, active sur MG, était identique à l'agglutinine normale, active sur MS, nous aurions le droit, puisque nous venons de démontrer que l'agglutinine normale impressionnant MG diffère sûrement de l'agglutinine d'immunsérum si puissante à l'égard de MS, d'affirmer que celle-ci diffère sûrement aussi de l'agglutinine normale active sur MS. Et nos expériences seraient alors favorables à cette thèse, dont l'intérêt pour la compréhension générale de l'immunité est évident, que les anticorps spécifiques élaborés grâce à l'immunisation ne sont pas identiques aux anticorps normaux préexistants, actifs sur le même microbe. Malheureusement, les expériences destinées à rechercher si, dans le sérum neuf, MG et MS réagissent avec la même agglutinine, n'ont donné que des résultats ambigus. Elles consistaient, on le devine, à mettre le sérum neuf en contact, soit avec MG, soit avec MS, et à rechercher, après contact prolongé et centrifugation, si chacun des liquides avait

perdu, pour l'un comme pour l'autre des deux microbes, son pouvoir agglutinant. On constate ainsi que, traité par MG, le sérum perd toute son activité vis-à-vis du même microbe MG, et qu'il la perd presque entièrement, mais non totalement, vis-à-vis de MS. L'essai réciproque conduit à un résultat analogue. Dans ces conditions, on ne peut exclure l'idée que le sérum renfermerait un mélange d'agglutinines, l'une ou les unes communes aux deux microbes, les autres plus spécialement appropriées à chacun d'eux ; à vrai dire, le problème est rendu peut-être plus complexe encore par l'intervention possible de substances antagonistes contrariant l'agglutination. Quoi qu'il en soit, nous reconnaissons volontiers que nos expériences sont plus instructives au point de vue de la variabilité des microbes sous l'influence du milieu de culture, qu'à celui des relations des immunosérums avec les sérums normaux.

*
* * *

A l'immunosérum dont il vient d'être question (et qui provenait d'un cheval immunisé contre MS), il était utile de comparer le sérum d'un animal vacciné contre l'autre race MG. Ne disposant pas d'un second cheval, nous avons immunisé parallèlement des lapins, soit contre MS, soit contre MG. Les animaux reçoivent, à 8-10 jours d'intervalle, 4 injections assez copieuses, et sont saignés 10 jours après la dernière injection. Soit dit en passant, les lapins qui reçoivent MG ne présentent aucun trouble, ceux qu'on injecte de MS maigrissent beaucoup, ce qui est en rapport avec la faculté toxigène de la race cultivée sur le milieu au sang.

Appelons anti-MS et anti-MG les deux sérums obtenus. Éprouvons tout d'abord leur pouvoir agglutinant à l'égard d'émulsions de MS et de MG préparées comme il a été dit plus haut ; il y a lieu de signaler à ce propos que le pouvoir agglutinant du sérum de lapin neuf vis-à-vis de MG et de MS est généralement très minime, pratiquement négligeable. On constate que : 1^o le sérum anti-MG agglutine très nettement MG, mais n'agglutine nullement MS. Donc, le sérum obtenu par injection de culture coquelucheuse développée sur gélose ne pourrait servir à reconnaître, au moins par l'agglutination, le microbe ensemencé sur

le milieu au sang; 2° le sérum anti-MS agglutine bien MS (1). Mais il agglutine aussi (à peu près aussi bien que le fait le sérum anti-MG) la race MG. On constate donc que les deux sérums ne se comportent pas symétriquement, puisque l'un d'eux n'agglutine qu'une race, tandis que l'autre les agglutine toutes deux.

La première question à résoudre est de savoir si c'est par l'intermédiaire d'un seul et même anticorps que ce sérum anti-MS agglutine les deux microbes.

Dans un tube A on verse 1,4 c. c. d'émulsion MG; dans un tube B, même dose d'émulsion MS; dans un tube C, quantité égale de solution physiologique. On ajoute à chacun des trois tubes 0,1 c. c. de sérum anti-MS. L'agglutination apparaît dans A et B, elle n'est pas absolument totale; les amas de MG sont plus visqueux, ceux de MS plus floconneux. Après un contact de plusieurs heures, on centrifuge, décante les liquides surnageants A et B. Chacun des liquides A, B, C est réparti, à dose de 0,5 c. c. dans deux tubes, dont l'un reçoit 0,2 c. c. d'émulsion MG, l'autre, même dose d'émulsion MS. Voici le résultat, au point de vue de l'agglutination :

ÉMULSION (0,2 c. c.)	IMMUNoSÉRUM TRAITÉ AU PRÉALABLE		IMMUNoSÉRUM Intact (liq. C).
	Par MG (liq. A).	Par MS (liq. B).	
MG	O	O	+
MS	+	O	+

Le microbe MS s'agglutine tout aussi énergiquement dans le sérum traité au préalable par MG que dans le liquide C; il n'y a aucune différence; nous retrouvons le fait signalé à propos de l'immunsérum de cheval, MG ne réagit aucunement avec l'agglutinine qui impressionne MS; celle-ci représente donc un anticorps spécifiquement et exclusivement dirigé contre ce dernier microbe. Cet anticorps doit être assimilé à celui qui agit, sur cette même race, avec tant d'intensité et de spécificité, dans l'immunsérum de cheval; si l'on cherche à l'utiliser pour le sérodiagnostic, il se montre inapte à dénoter la parenté qui unit les deux races microbiennes.

(1) Ce sérum de lapin est néanmoins beaucoup moins puissant que le sérum de cheval immunisé que nous avons considéré; le traitement du cheval avait été très prolongé.

Mais le sérum anti-MS, que nous venons de considérer, doit contenir une seconde agglutinine qui, contrairement à la première, agit sur MG et est absorbable par lui; elle est également absorbable d'ailleurs par MS. C'est ce qui résulte du tableau ci-dessus. Chose curieuse, bien que se trouvant dans le sérum anti-MS, bien qu'étant fixée par MS comme elle l'est par MG, elle ne doit intervenir que d'une manière absolument négligeable dans l'agglutination de MS par ce sérum anti-MS. En effet, s'il en était autrement, le contact préalable de ce même sérum avec MG aurait comme conséquence d'en diminuer notablement le pouvoir agglutinant vis-à-vis de MS, ce qui n'est pas. Donc, s'il est certain que le sérum anti-MS contient deux agglutinines distinctes, il faut admettre néanmoins que MS, tout en fixant ces deux anticorps, ne se laisse agglutiner que par l'un d'eux. Le récepteur pour le second existe chez MS, mais la saturation de ce récepteur ne détermine pas l'effet visible auquel on s'attendrait, c'est-à-dire l'agglutination, qui, pourtant, s'observe lorsque ce second anticorps agit sur MG. L'expérience corrobore en outre, il convient de le signaler, cette notion que les principes actifs apparus grâce à l'immunisation sont intégralement absorbables par le microbe qui a servi d'antigène. Quant au sérum anti-MG, nous avons dit qu'il n'agglutinait pas MS. Le MG ne possède donc pas l'antigène capable de faire apparaître l'anticorps qui provoque l'agglutination de MS; nous venons de voir d'ailleurs qu'il ne possède pas davantage le récepteur capable de l'absorber; ces deux notions s'harmonisent, en ce sens qu'il y a coïncidence entre l'absence de l'antigène et l'absence du récepteur.

Mais le sérum anti-MG agglutine MG. Les deux races sont-elles toutes deux capables d'absorber cette agglutinine?

L'expérience est identique à la précédente, sauf qu'au lieu de sérum anti-MS, on emploie le sérum anti-MG. On constate ainsi qu'un contact avec MG dépouille le sérum de son pouvoir agglutinant vis-à-vis de MG, mais que MS ne se comporte pas de même: il ne soustrait au liquide (dans lequel d'ailleurs il ne s'agglutine pas), qu'une fraction négligeable de cet anticorps.

Si nous comparons ce résultat à celui qui précède, nous sommes forcés d'admettre que ce n'est point par l'intermédiaire du même anticorps que les sérums anti-MG et anti-MS agglutinent MG. En effet, celui que contient le sérum anti-MS est absorbable

par les deux races, celui que le sérum anti-MG renferme ne l'est que par MG. Au surplus, ces deux agglutinines se distinguent encore à un autre point de vue. Les deux sérums agglutinent MG; mais à dose forte, c'est le sérum anti-MS qui l'agglutine le mieux; à dose faible, c'est le sérum anti-MG. Pour ce qui concerne ce dernier, l'agglutination est contrariée lorsqu'on emploie trop de sérum. Voici une expérience qui met ces particularités en évidence :

Dans 4 tubes A, B, C, D, on verse 1 c. c. d'émulsion de MG. On ajoute à A, 0,05 c. c. de sérum anti-MG; à B, 0,05 c. c. de sérum anti-MS; à C, 0,15 c. c. de sérum anti-MG; à D, 0,15 c. c. de sérum anti-MS. Les deux derniers tubes ont donc reçu respectivement les mêmes sérums que les deux premiers, mais en dose triple. On constate que A et D s'agglutinent très fortement; l'agglutination est faible dans B et surtout dans C; le lendemain, les contrastes sont encore très manifestes. Le tube A a présenté une forte agglutination, parce qu'il contient relativement beaucoup de microbes et peu de sérum; en effet, si l'on prépare un mélange identique, sauf qu'on emploie même dose d'une émulsion trois fois moins riche en microbes, on n'observe qu'une agglutination extrêmement faible.

Que le sérum anti-MS agglutine mieux à forte dose, cela tient évidemment à ce que son activité vis-à-vis de MG est assez médiocre. Mais, pour ce qui concerne le sérum anti-MG, la raison de l'obstacle apporté à l'agglutination par un excès de sérum réside, non pas en ce que l'anticorps proprement dit agit mal à grande dose, mais en ce qu'il existe dans le sérum des substances antagonistes à l'agglutination, lesquelles se rencontrent d'ailleurs tout aussi bien dans le sérum normal. En effet, si l'on fait agir sur de l'émulsion de MG du sérum anti-MG en petite quantité (c'est-à-dire à dose favorable à l'agglutination), mais en ajoutant en même temps un certain volume de sérum de lapin neuf (chauffé à 56°), l'agglutination est empêchée.

On introduit dans un tube A, 0,05 c. c. de sérum anti-MG; dans un tube B, 0,2 c. c. du même sérum; dans un tube C, 0,2 c. c. de sérum normal de lapin; dans un tube D, 0,05 c. c. de sérum anti-MG et 0,15 c. c. de sérum normal. On ajoute aux 4 tubes 1 c. c. d'émulsion MG. Au bout de trois quarts d'heure, A est le seul qui soit agglutiné. Le lendemain, C n'a pas changé, B et D ne présentent qu'une agglutination légère; celle qu'on observe en A est très forte.

Le sérum renferme, on le voit, certains constituants qui tendent à disséminer les microbes en les maintenant en un état plus

parfait d'émulsion, qui donc exercent une influence contraire à celle de l'anticorps agglutinant. Ce fait est vraisemblablement fort comparable à ceux que Gengou notamment a étudiés dans ses recherches sur l'adhésion moléculaire. Par exemple, le sérum, qui dissémine le sulfate de baryte, l'empêche de s'accoler aux globules rouges (1).

Le fait qu'un excès de sérum ne met pas obstacle à l'agglutination, quand il s'agit du sérum anti-MS, corrobore l'idée qu'il n'y a pas identité entre les deux agglutinines actives sur MG et dont l'une existe dans ce dernier sérum, l'autre dans le sérum anti-MG. A cette diversité des anticorps correspond une diversité des récepteurs.

* * *

Pour mettre en relief d'une manière plus frappante encore l'influence du milieu nutritif sur l'aptitude du microbe coque-lucheux à réagir avec les diverses agglutinines, il est une expérience très simple, qui consiste à réensemencer sur milieu au sang la race MG qui, pendant un temps assez prolongé, a été maintenue constamment sur gélose ordinaire et a subi les modifications de récepteurs et d'antigènes que nous avons signalées. Chose remarquable, transporté sur milieu au sang, le microbe MG reprend très rapidement, presque complètement même dès la première culture, les attributs de la variété MS, en perdant corrélativement les caractères spéciaux qui le distinguaient lorsqu'il poussait sur gélose. La transformation de MS en MG est donc réversible, elle l'est même très promptement. On peut, d'ailleurs, avec le même résultat, employer comme milieu au sang dans cette expérience, non pas la gélose de composition assez spéciale que nous avons décrite (et qui, au lieu de bouillon peptonisé, renferme un peu d'extrait de pomme de terre glyciné), mais tout simplement de la gélose ordinaire (bouillon-peptone) que l'on fait fondre et à laquelle on incorpore du sang défibriné ou même du sérum

(1) De telles constatations nous conduisent à la remarque suivante : lorsqu'on observe qu'un sérum normal n'agglutine pas un microbe, on n'est pas autorisé à conclure qu'il ne contient aucun anticorps agglutinant. En réalité, le sérum normal de lapin n'est pas, à l'égard de MG, dénué de toute agglutinine, mais les effets de l'anticorps sont masqués par l'influence antagoniste. Si l'on mélange de l'émulsion MG à du sérum normal, qu'après contact on centrifuge et décante le liquide surnageant, afin d'éliminer l'excès de sérum, le sédiment, délayé dans de la solution physiologique, s'agglutine légèrement,

de lapin. A part ce sang ou sérum, une telle gélose est identique à la gélose ordinaire; l'emploi comparatif de ces deux milieux permet donc de démontrer nettement le rôle du sang ou du sérum dans l'apparition des propriétés qui différencient les deux races. Appelons MGS ce microbe MG ensemencé sur milieu au sang et recherchons comment il se comporte vis-à-vis de l'immunsérum de cheval considéré plus haut, et dont le pouvoir agglutinant, si énergique, ne se manifeste qu'à l'égard de MS.

A 4 tubes contenant 1,4 c. c., soit d'émulsion MG (tube A), soit d'émulsion MGS (B), soit d'émulsion MS (C), soit de solution physiologique (D), ajoutons 0,1 c.c. de solution physiologique contenant 1 /300 de c.c. d'immunsérum. On constate que A ne s'agglutine pas, mais que B et C s'agglutinent vite et fortement; l'agglutination est toutefois un peu plus puissante encore dans C que dans B. Après 4 heures de contact, on centrifuge. De chaque liquide, on verse 0,5 c. c. dans deux tubes, qui reçoivent ensuite 0,3 c. c. d'émulsion, soit de MG, soit de MS.

ÉMULSION (0,3 c. c.)	IMMUNSÉRUM TRAITÉ AU PRÉALABLE PAR			IMMUNSÉRUM intact (llq. D).
	MG (llq. A).	MGS (llq. B).	MS (llq. C).	
MG	O	O	O	O
MS	+	Très faible.	O	+

Comme dans l'expérience citée plus haut, le traitement par MG n'enlève aucunement l'agglutinine de l'immunsérum, active sur MS. Mais le traitement par MGS l'en dépouille presque complètement, MGS se comportant donc à peu près comme MS; il ressemble d'ailleurs à ce dernier en ce qu'il est fortement agglutinable. Une expérience analogue, réalisée avec le sérum anti-MS provenant du lapin, donne des résultats concordants.

Transporté sur milieu au sang, MG reprend les caractères de MS. En même temps, il perd les caractères de MG. C'est ce qu'on démontre en étudiant MGS, par rapport au sérum de lapin anti-MG. En effet, contrairement à MG, MGS n'est pas agglutinable par ce sérum; à cet égard, il se comporte donc absolument comme MS. De même, il n'en enlève pas non plus l'agglutinine active sur MG.

Pour compléter ces données relatives à l'agglutination, ajoutons que MS est nettement agglutinable par le sérum d'enfants convalescents de coqueluche, tandis que MG ne l'est pas. Le microbe qui parasite l'organisme se comporte donc plutôt, ce qui est assez logique, comme une race développée sur milieu au sang que comme une race cultivée sur gélose ordinaire; nous retrouverons cette considération à propos du pouvoir sensibilisateur.

* * *

On ne parvient pas à différencier aussi nettement les deux races lorsqu'on emploie comme réactif, non l'influence agglutinante, mais le pouvoir sensibilisateur des sérums, c'est-à-dire lorsqu'on applique la méthode de la fixation de l'alexine. A vrai dire, ce n'est pas étonnant. Dans l'agglutination des microbes ne peuvent intervenir que des récepteurs intramicrobiens; au contraire, les substances capables, lorsqu'elles sont sensibilisées, d'absorber l'alexine, peuvent se rencontrer, non seulement dans le microbe lui-même, mais aussi parmi les produits microbiens en dissolution dans le liquide qui sert de véhicule. Les produits précipitables par l'immunsérum se montrent avides d'alexine; il suffit de rappeler les recherches de Gengou, étendues aux produits microbiens par divers savants, notamment Weil et Axamit, Toyosumi. Comme l'a montré Dopter (1) il y a longtemps déjà, la spécificité plus grande de l'agglutination se révèle aussi quand on étudie les variétés, fournies par la nature, de bacilles dysentériques. Pour des raisons analogues, Hændel a vu, en étudiant les vibrions, que les bactériolysines se montrent plus spécifiques que le pouvoir de provoquer l'absorption d'alexine.

Les deux immunsérums de lapins (anti-MS et anti-MG) provoquent la fixation de l'alexine (on emploie comme complément du sérum frais de cobaye) indifféremment par l'une ou l'autre race. Il est curieux de constater que le sérum anti-MG, qui n'agglutine absolument pas l'émulsion de MS, lui confère néanmoins le pouvoir d'absorber le complément.

Toutefois, l'immunsérum du cheval (lequel, comme il a été dit, a été obtenu par des injections de MS) employé à dose pas trop forte, 0,05 c. c. par exemple pour 1 c. c. d'émulsion et 0,05 d'alexine (sérum frais de cobaye), distingue dans une cer-

(1) *Ces Annales*, 1905.

taine mesure les deux races. Sous son influence, MS absorbe l'alexine plus complètement que ne le fait MG. Dans l'émulsion de celui-ci, les globules sensibilisés introduits à la fin de l'expérience s'hémo lysent très lentement, tandis qu'ils restent intacts dans le mélange contenant MS.

Le sérum d'enfant convalescent de coqueluche distingue plus nettement les deux races : on verse, dans un tube A, 0,3 c. c. d'émulsion MS; dans un tube B, 0,3 c. c. d'émulsion MG; on additionne les deux tubes de 0,15 c. c. de sérum d'enfant convalescent (chauffé à 56°). Il est superflu de décrire les mélanges de contrôle, tels que ceux où le sérum d'enfant est remplacé par du sérum humain normal, etc. On ajoute aux divers tubes 0,05 c. c. de sérum frais de cobaye. On constate que A s'agglutine, ce qu'on n'observe pas dans B. Quatre heures plus tard, on ajoute 0,03 c. c. de sang de chèvre sensibilisé au préalable par volume égal de sérum de lapin anti-chèvre. Les contrôles s'hémo lysent en 15 à 20 minutes; dans B, l'hémolyse est visible après 40 minutes et est presque complète après 1 heure. A est encore intact le lendemain. L'un de nous a mentionné ces faits ailleurs en insistant sur les précautions dont il faut entourer l'étude du sérum des enfants convalescents au point de vue du pouvoir sensibilisateur (1).

Nous venons de rappeler cette notion que l'absorption d'alexine survenant dans un mélange d'émulsion microbienne et d'immunsérum représente une action totale à laquelle participent vraisemblablement des récepteurs divers, intra ou extra microbiens. Mais la méthode de la cong lutation permet une analyse plus délicate, car le phénomène visible que l'on constate en l'appliquant dépend exclusivement des récepteurs intramicrobiens chargés d'alexine.

Nous croyons inutile de rappeler en détail ce qu'est le phénomène de la cong lutation. Comme l'ont montré Bordet et Gay (2), le sérum de bœuf contient une substance (résistant au chauffage à 56°) qui n'entre pas en réaction avec les globules lorsqu'ils sont normaux ou ont fixé uniquement de la sensibilisatrice, mais qui se précipite sur eux lorsqu'ils sont chargés d'alexine. Cette condensation sur les hématies provoque chez celles-ci une agglutination extrêmement forte (cong lutation). Permettant de

(1) *Centralblatt f. Bakter. Referate*. Bd. XLIII, 1909.

(2) *Ces Annales*, 1906.

reconnaître si des globules ont absorbé de l'alexine, la réaction peut évidemment servir aussi à déceler la présence de sensibilisatrices capables d'impressionner ces éléments. Bordet et Streng (1) ont repris récemment l'étude plus détaillée de ce phénomène; Streng (2) a constaté que les microbes se comportent exactement comme les globules et qu'on peut en conséquence utiliser la congglutination pour mettre en évidence les sensibilisatrices antimicrobiennes. Mais, tandis que la méthode de la fixation du complément de Bordet-Gengou constate simplement que l'alexine a été absorbée, sans indiquer sur quoi elle s'est portée, sans préciser si elle a été saisie par les microbes ou s'est fixée sur des produits microbiens excrétés dans le liquide, la méthode de la congglutination exige, pour donner un résultat positif, que les microbes eux-mêmes se soient emparés d'alexine.

Comme source de congglutinine, on peut se servir simplement de sérum de bœuf chauffé au préalable à 56°. Mais il vaut mieux extraire la substance active, de manière à éviter l'ingérence des anticorps normaux que le sérum de bœuf est susceptible de renfermer. Une technique très simple et rapide consiste à faire barboter du gaz CO² dans 9 c. c. d'eau distillée, à ajouter 1 c. c. de sérum de bœuf 56°, à faire passer encore un peu de gaz, puis à centrifuger. On décante le liquide surnageant qu'on rejette, et l'on verse, sur le sédiment de globulines obtenu, 2 c. c. de solution physiologique à 0,9 0/0. On agite, et l'on obtient ainsi une solution très active de congglutinine.

Or, mise à profit pour l'étude de nos deux immunsérums de lapin, cette méthode montre que MS ne se congglutine que sous l'influence du sérum anti-MS. On verse dans trois tubes 0,5 c. c. d'émulsion MS et 0,05 c. c. de sérum frais de cobaye (alexine). On ajoute, au tube A, 0,05 c. c. de sérum de lapin normal (chauffé à 56°); au tube B, de sérum anti-MG; au tube C, de sérum anti-MS. On additionne les trois tubes de 0,2 c. c. de congglutinine. Dans C survient une congglutination très intense, qu'on n'observe ni dans A ni dans B. Donc, c'est uniquement dans le sérum anti-MS qu'existe une sensibilisatrice active sur les récepteurs du

(1) *Centralbl. j. Bakter. Orig. Bd. XLIX*, 1909.

(2) *Centralbl. j. Bakter. Orig. Pd. I.*, 1909.

microbe lui-même, d'où dépend le phénomène de la congutination (1).

A vrai dire, cette méthode de la congutination n'est pas applicable à tous les microbes (2), en raison de l'ingérence perturbatrice des sensibilisatrices normales du sérum frais de cobaye, lesquelles déterminent parfois une absorption d'alexine suffisante à produire la congutination. C'est le cas notamment pour MG; cette race est apte à fixer le complément, et corrélativement à se congutiner, sans qu'il soit nécessaire d'ajouter de l'immunsérum.

CONCLUSIONS

Le présent mémoire est une contribution à l'étude de l'origine des races microbiennes. Les échantillons divers d'une même espèce microbienne, que la nature nous fournit, peuvent présenter entre eux certaines différences, révélables notamment par le sérodiagnostic; on peut citer comme exemple, à ce point de vue, le bacille dysentérique, le groupe encore assez confus des paratyphiques, peut-être même le bacille typhique, etc. Comme l'a montré fort bien Dopter, à propos des bacilles dysentériques, (certains auteurs, notamment Hændel, ont fait des constatations analogues à propos d'autres microbes), les races d'un même microbe que nous offre la nature, se distinguent beaucoup plus nettement lorsque, pour les différencier, on met en œuvre les agglutinines spécifiques que lorsqu'on a recours à la méthode de la fixation de l'alexine (complément). Non seulement, deux races d'un même microbe peuvent ne pas se comporter identiquement vis-à-vis d'une même agglutinine, mais encore, injectées aux animaux, elles peuvent provoquer l'apparition d'anticorps agglutinants que l'on ne saurait confondre.

Or, ces différences ne sont réellement pas très profondes, et les causes dont elles dépendent semblent ne pas devoir échapper à l'expérimentation. On constate en effet que le microbe coquelucheux se modifie suivant son milieu de culture; on obtient de la sorte deux races qui, au point de vue des réactions d'immunité, présentent entre elles des différences fort comparables à celles qui séparent les variétés naturelles de bacille dysentérique, par

(1) Le sérum d'enfant convalescent de coqueluche ou bien encore l'immunsérum de cheval, peuvent remplacer le sérum de lapin anti-M S dans une semblable expérience.

(2) Nous renvoyons à ce propos au mémoire de Streng.

exemple. Elles se distinguent par les récepteurs et les antigènes en rapport avec l'agglutination; injectées aux animaux, elles donnent des immunisérums qui ne sont pas identiques. Des faits particulièrement frappants consistent en ce que le microbe, cultivé sur gélose ordinaire, n'est aucunement sensible ni combinable à l'agglutinine spécifiquement active vis-à-vis du microbe cultivé sur milieu au sang (obtenue par immunisation contre cette dernière race) et que, d'autre part, les animaux traités par les cultures sur gélose ordinaire donnent un sérum n'exerçant aucune influence agglutinante sur l'autre variété. Par contre, la méthode Bordet-Gengou de la fixation de l'alexine peut révéler (c'est le cas aussi pour les variétés de *b. dysentérique*, et l'analogie entre les races naturelles et expérimentales se poursuit ici) la parenté qui unit les différentes cultures. Il y a intérêt à comparer cette méthode à celle de la congglutination.

On est conduit dès lors à admettre — et nous partageons à cet égard l'opinion de Grassberger et Schattenfroh — qu'au moins pour ce qui concerne le pouvoir agglutinant, les immunisérums ne portent point leur action sur des substances microbiennes fondamentales, inhérentes à la vie, dont la présence est nécessairement liée à la nature, à la constitution même de l'espèce, mais sur des matières en quelque sorte accessoires, d'apparition possible mais facultative, dont l'élaboration ne fait nullement partie du faisceau des caractères héréditaires immuables qui donnent à l'être vivant sa physionomie propre et son autonomie.

¶ A vrai dire, la race nouvelle que la culture sur gélose ordinaire a permis de créer retourne rapidement au type primitif lorsqu'on la ramène à son milieu nutritif initial, le milieu au sang. Un facteur important pour la conservation des caractères nouveaux acquis par les microbes, c'est le temps d'action de l'influence modificatrice. Aussi comptons-nous rechercher si, après une période très prolongée de culture sur gélose ordinaire, le microbe revient encore avec la même promptitude à son état originel lorsqu'on le replante sur le milieu au sang. Quoi qu'il en soit, on peut assez légitimement supposer que les races naturelles, même lorsqu'elles sont plus stables, résultent d'un déterminisme analogue. Au surplus, des races aberrantes (de *b. typhique*, par exemple) se ramènent assez souvent, sans trop de retard, au type habituel, lorsqu'on les entretient dans les laboratoires.

Influence de l'acide borique

sur les actions diastasiques

PAR HENRI AGULHON.

(Travail du Laboratoire de M. Gabriel Bertrand.)

L'étude de l'influence des acides sur les actions diastasiques a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Nous ne trouvons cependant que très peu de renseignements sur l'action de l'acide borique : la faiblesse de sa fonction acide l'a rendu sans doute peu intéressant pour les auteurs et ils l'ont volontairement écarté de leurs travaux. Des études récentes, tendant à limiter le maximum d'activité à la réaction neutre au méthylorange pour l'amylase (MAQUENNE et ROUX (1), FERNBACH et WOLF) (2) et pour la laccase (G. BERTRAND) (3), donnent au contraire un intérêt à l'étude de l'action sur les diastases des corps d'acidité analogue à celle des phosphates alcalins monobasiques : c'est le cas de l'acide borique. Il répond à la double règle établie par G. Bertrand pour les corps inactifs sur la laccase : la saturation de son premier hydrogène par la soude dégage seulement 11,6 calories, et il est neutre à l'hélianthine. Il est légèrement acide au tournesol, et acide à la phtaléine; avec l'alizarine sulfoconjuguée il donne une teinte jaune bis. Ce dernier réactif coloré n'est pas sans manquer d'intérêt pour l'étude des réactions des divers milieux. Bien que n'offrant dans une titration que le virage du jaune au rose, correspondant au virage de l'hélianthine, l'alizarine sulfoconjuguée en solution aqueuse est susceptible

(1) MAQUENNE et ROUX. *Annales de Physique et de Chimie*, 8^e série, t. IX, p. 1909.

(2) A. FERNBACH et J. WOLF. Étude sur la saccharification des empois de fécule *Comptes rendus Ac. des Sc.*, t. CXLV, p. 261.

(3) G. BERTRAND. Recherches sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la laccase. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 657.

d'une série de quatre colorations (1) bien différentes les unes des autres :

1° Jaune franc, un peu verdâtre, avec les acides forts, le citrate monosodique, l'oxalate monosodique, l'acide carbonique;

2° Jaune bis, avec l'acide borique, les citrates bialcalins, les phosphates monoalcalins;

3° Rose, avec le citrate trisodique, les phosphates bialcalins, les bicarbonates alcalins, les oxalates neutres;

4° Violet rose, avec les carbonates alcalins, les silicates alcalins et les alcalis libres.

L'addition de mannite et de glycérine à l'acide borique le fait passer du groupe 2 au groupe 1.

Ainsi, à lui seul, ce réactif permet de classer les diverses réactions des milieux en quatre groupes qui correspondent assez bien (sauf pour quelques cas comme CO^2 , par exemple) aux colorations du méthylorange, d'une part, à celles de la phtaléine, d'autre part. Nous aurons occasion, dans le cours de ce travail, de voir l'usage qu'on peut tirer de l'emploi de ce réactif dans les études diastasiques.

A peu près tout ce qui est connu à l'heure actuelle de l'action de l'acide borique sur les diastases a trait à son inactivité. PETIT (2) note son inactivité sur la pepsine; DUCLAUX (3) le prétend sans action sur la sucrase, contredisant en cela un travail de WERNITZ (4) où il est affirmé que l'acide borique, dès la concentration de 1/3.250^e rend la sucrase inactive.

(1) Cette série de coloration est due à la formation des différents sels de l'acide alizarine sulfonique. Ils sont au nombre de trois :

1° Les sels de formule $\text{C}^{14}\text{H}^3\text{O}^2(\text{OH})^2\text{SO}^3\text{M}$ qui sont orangés ou jaunes,

2° Les sels $\text{C}^{14}\text{H}^3\text{O}^2 \left\{ \begin{array}{l} \text{SO}^3\text{M} \\ \text{OM} \\ \text{OH} \end{array} \right.$

qui sont violet-rouge pour les métaux alcalins, rouges pour les alcalino-terreux.

3° Les sels $\text{C}^{14}\text{H}^3\text{O}^2 \left\{ \begin{array}{l} \text{SO}^3\text{M} \\ \text{OM} \\ \text{OM} \end{array} \right.$

qui sont violets.

(G. GRAEBE. *Ueber Alizarinsulfonsaure*. — *Berichte Deutsch. Chem. Gesell.*, t. XII, p. 571, 1879).

(2) PETIT. *Recherches sur la pepsine*. Thèse, Paris, 1880.

(3) DUCLAUX. *Traité de Chimie Biologique*, p. 181.

(4) WERNITZ. *Dissert. Inaug.* Dorpat, 1880.

G. BERTRAND (1) constate la neutralité de son action sur la lactase, puis sur les peroxydiastases (2).

La seule action empêchante signalée est l'action sur la présure; DUCLAUX, dans son *Traité de Microbiologie* (3), prête à l'acide borique une action analogue à celle du borax : « Il augmente la transparence du lait et retarde aussi l'action de la présure. La coagulation devient cinq fois plus lente avec 1 p. 2.000 d'acide borique et vingt fois plus lente avec 1 p. 1.000 » et Duclaux donne ainsi une explication de son emploi industriel pour la conservation du lait : « L'acide borique paralyse l'action des présures produites par les ferments de la caséine ». En 1908, GERBER (4) obtient des résultats qui contredisent formellement les données de Duclaux; il constate une accélération très nette de la coagulation du lait emprésuré par l'addition d'acide borique.

En résumé, l'action de l'acide borique a été étudiée sur cinq phénomènes diastasiques seulement, et, pour deux des cas, les auteurs se trouvent en contradiction. J'ai entrepris l'étude systématique de cette action sur un certain nombre de diastases; j'exposerai les résultats obtenus en suivant la classification parfois un peu arbitraire des diastases en :

Diastases hydrolysantes;

Diastases coagulantes;

Diastases oxydantes.

§ 1^{er} DIASTASES HYDROLYSANTES

SUCRASE. — J'ai étudié l'action de l'acide borique sur la sucrase préparée à partir des levures et celle fournie par l'*Aspergillus niger*.

1^o *Sucrase de levure*. — On obtient, en broyant au mortier, un poids égal de sable siliceux bien pur et de levure de boulangerie dans son double poids d'eau, une solution active de

(1) *Loc. cit.*

(2) G. BERTRAND et M^{lle} ROZENBAND. Action de quelques acides sur les peroxydiastases. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, t. V, p. 296, 1909.

(3) DUCLAUX. *Microbiologie*, t. II, p. 377.

(4) GERBER. Action accélératrice de certains paralysants classiques des présures. II. Acide borique. — *C. R. Soc. de Biologie*, t. LXIV, p. 1178, 1908.

sucrase. Après filtration, la solution est limpide; elle est légèrement acide au tournesol, mais plutôt alcaline à l'alizarine sulfoconjuguée avec laquelle elle donne une coloration rosée.

5 c. c. d'une solution de saccharose à 20 0/0 étaient additionnés de 1 c. c. de solution diastasique et on complétait à 10 c. c. avec de l'eau distillée pure ou contenant en dissolution les doses déterminées d'acide borique. Des témoins avec diastase bouillie étaient préparés pour chaque dose. C'est là une précaution que j'ai d'ailleurs toujours prise pour toutes les expériences qui font l'objet de ce travail. Le tout était porté dans un bain-marie réglé à température constante. Au bout du temps désiré, on arrêtait l'action diastasique par addition d'un excès de soude et le sucre réducteur formé était dosé par la méthode indiquée par G. BERTRAND (1).

Le tableau suivant donne les résultats obtenus dans une première série d'expériences faites avec des doses relativement élevées, variant de 3 à 6 grammes par litre :

Acide borique en millionièmes	Sucre réducteur formé 0/0 cc. de liquide.		
	1 h. à 17°	1 h. à 55°	3 h. à 52°
0	3 gr. 25	5 gr. 63	6 gr. 21
3.000	3 gr. 31	5 gr. 65	6 gr. 28
6.000	3 gr. 45	5 gr. 75	6 gr. 07
9.000	3 gr. 36	5 gr. 65	5 gr. 89
12.000		5 gr. 47	5 gr. 55

L'action empêchante de l'acide borique sur la sucrase, annoncée par Wernitz, n'est donc nullement retrouvée. Au contraire, les doses entre 3 et 6 grammes par litre nous semblent avoir une très légère influence favorisante, plus accentuée si l'on se trouve éloigné de la température optima. Nous sommes amenés à nous demander si l'action de l'acide borique sur la sucrase ne présenterait pas une courbe à maximum analogue à celles obtenues par Fernbach (2) pour l'action des acides forts. Le maximum aurait déjà été dépassé dans les expériences du tableau précédent. Voici les résultats expérimentaux obtenus pour des doses très variées d'acide borique :

(1) G. BERTRAND. Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, t. XXXV, p. 1285, 1906.

(2) A. FERNBACH. *Recherches sur la sucrase*. Thèse, Paris, 1890.

Acide borique en mgr. par litre.	Sucre réducteur 0/0 cc. liq. 2 h. à 52°.	Acide borique en mgr. par litre.	Sucre réducteur 0/0 cc. liq. 2 h. à 52°.
0	3 gr. 88	1.000	4 gr. 19
25	3 gr. 92	2.000	4 gr. 10
50	4 gr. 05	6.000	4 gr. 08
100	3 gr. 92	12.000	3 gr. 86
200	4 gr.	30.000	3 gr. 57
500	4 gr. 19		

Bien que peu élevée, la courbe est très nette. L'action favorisante se manifeste jusqu'à des doses de 6 grammes par litre; un optimum est visible et soutenu vers des doses de 0 gr. 5 à 1 gramme par litre. L'influence nettement défavorable ne commence guère qu'au delà de 12 grammes par litre; en présence de 30 grammes par litre la sucrase se comporte encore très bien puisque la quantité de sucre réducteur formée est, avec celle formée dans le témoin sans acide borique, dans le rapport de 9/10.

2° *Sucrase d'Aspergillus*. — Avec la sucrase de l'*Aspergillus niger*, préparée d'après la méthode indiquée par Fernbach, l'existence d'une courbe de l'action de l'acide borique est encore plus nette. La solution de sucrase est neutre au tournesol; elle est très peu active si on ne l'additionne d'aucune trace d'acide. J'ai suivi la même technique que pour les expériences précédemment décrites sur la sucrase de levure. Malgré sa faible acidité, l'acide borique est susceptible de renforcer l'activité de la sucrase d'*Aspergillus*, jusqu'à 1/3 en plus de son activité primitive pour la dose optima qui est pour des concentrations bien plus élevées que dans le cas de la sucrase de levure (12 grammes par litre). Cela ressort nettement des chiffres suivants :

Acide borique en millionièmes	Sucre réducteur 0/0 cc. de liquide.	
	1 h. à 50°	2 h. à 52°
0	0 gr. 235	0 gr. 508
25	0 gr. 285	0 gr. 540
50	0 gr. 301	
100	0 gr. 282	0 gr. 523
200	0 gr. 285	0 gr. 572
500	0 gr. 248	0 gr. 617
1.000	0 gr. 246	0 gr. 661
2.000	0 gr. 324	0 gr. 630
6.000	0 gr. 382	0 gr. 770
12.000	0 gr. 385	0 gr. 775
30.000	0 gr. 363	0 gr. 770

Il est curieux de voir combien nous sommes loin d'une action empêchante, puisque en présence de 30 grammes par litre nous voyons la diastase agir plus activement qu'en l'absence d'acide borique.

En résumé, on peut dire que, pour la sucrase d'*Aspergillus* ou de levure, l'acide borique n'est à aucune dose un empêchant. Sa dose optima est très élevée : 12 grammes par litre. Dans le cas de la levure, cet optimum est abaissé et la courbe est peu accentuée. Il y a sans doute dans l'extrait de levure des sels dont l'acide borique à dose élevée déplacerait l'acide : ce ne serait plus alors l'action de l'acide borique seul que nous observerions. Avec la préparation de sucrase d'*Aspergillus*, qui est relativement très pure, la courbe peut s'élever plus longtemps.

Il n'y a pas lieu de tenir compte de l'action hydrolysante de l'acide borique aux températures auxquelles on expérimente : les tubes témoins, à diastase bouillie et doses croissantes d'acide, ne présentent entre eux que des différences inappréciables, sans rapport visible avec leurs teneurs en acide.

AMYLASE. — Ainsi qu'on pouvait s'y attendre après les travaux de MAQUENNE et ROUX et de FERNBACH et WOLF, l'acide borique, neutre à l'hélianthine, ne présente aucune action empêchante bien nette sur les amylases végétale et animale. La liquéfaction de l'empois et la formation du maltose ne sont que très faiblement influencées par la présence, même en quantité relativement considérable, de cet acide.

1° *Amylase végétale. Liquéfaction de l'empois.* — On met dans deux becherglass 50 grammes d'empois d'amidon à 10 0/0, préalablement neutralisé. A l'un d'eux on ajoute 10 milligrammes d'acide borique. On les additionne de 4 c. c. d'extrait de malt à 10 0/0. On laisse 7 minutes en contact en agitant de temps en temps; on ajoute alors 1 c. c. de soude normale pour arrêter l'action diastasique et on mesure la viscosité par le temps que met à se vider une même burette pleine de l'un ou l'autre des liquides.

J'ai obtenu les chiffres suivants dans deux expériences successives. La burette employée se vidait d'eau distillée en 25'' :

De l'amidon fait avec de l'eau boriquée (3 0/0) est d'ailleurs rapidement liquéfié par l'extrait de malt. L'extrait de malt fait avec de l'eau boriquée possède toute son activité, et cette propriété peut être employée pour avoir des extraits qui ne fermentent pas rapidement.

Une faible quantité de borax entrave au contraire l'action de la diastase; son alcalinité en est la cause, ainsi que celle de toutes les influences empêchantes du borax observées par J.-B. DUMAS (1) sur différents ferments solubles.

Formation de sucre réducteur. — Dans deux vases on met 100 grammes d'empois d'amidon à 10 0/0 auquel on ajoute :

A. 50 c. c d'eau distillée;

B. 50 c. c. d'eau boriquée (3 0/0);

Puis 50 c. c. d'un extrait de malt à 10 0/0.

La liquéfaction est instantanée. On place les deux vases dans une étuve à 35° et on suit la formation du sucre en comptant le nombre de gouttes des deux liquides qui décolorent 5 c. c. de réactif de Fehling après des temps donnés :

Après	A	B
0 h. 3/4	40 gouttes	40 gouttes
1 h. 1/2	30 —	30 —
4 h.	23 —	23 —
6 h.	23 —	22 —

Ainsi nous ne voyons aucune différence dans la vitesse de formation du maltose par l'extrait de malt en l'absence d'acide borique ou en présence de cet acide à la concentration pourtant élevée de 1 0/0.

De nombreux essais faits avec des extraits de blé germiné et non germé m'ont donné des résultats identiques.

2° *Amylase animale.* — J'ai employé pour ces essais la pancréatine de Merck en solution filtrée à 1 0/0. Dix c.c. d'un empois d'amidon à 5 0/0 sont additionnés de quantités variées d'acide borique et de 1 c. c. de solution de pancréatine. L'attaque est faite au bain-marie réglé à 40°. Après le temps d'action désiré, on dose le sucre par la méthode de G. BERTRAND. Voici les résultats de deux expériences, faites dans ces conditions :

Acide borique en millièmes.	Sucre réducteur formé	
0	63 mgr. 6	106 mgr. 5
50		105 mgr. 5
500	66 mgr. 3	108 mgr. 1
7.500	62 mgr. 1	100 mgr. 5
13.500	56 mgr. 6	88 mgr. 0
13.500 (diastase bouillie) aucune réduction.		

Les deux expériences, bien que non comparables entre elles

(1) J.-B. DUMAS. *C. R. Acad. Sciences*, t. LXXV, p 181, 1872.

pour les valeurs absolues de sucre dosé (ce dernier n'a pas été titré sur une même quantité de liquide), le sont très nettement quant à la marche du phénomène. Celle-ci peut être exprimée par une courbe légèrement ascendante jusqu'à des doses de 500 millièmes; puis, pour les doses supérieures, une légère diminution du sucre produit apparaît. Si nous étudions quelle est la réaction des milieux des divers essais vis-à-vis des indicateurs colorés, nous voyons que, quelle que soit la dose d'acide borique, ils sont neutres à l'hélianthine et qu'ils virent légèrement le papier de tournesol à la teinte acide. L'alizarine sulfoconjuguée nous montre au contraire des différences entre eux. Jusqu'à la dose de 500 millièmes, la coloration par l'alizarine est très nettement rose; pour les doses supérieures elle est jaune bis. Il est à remarquer que le point maximum de notre courbe paraît antérieur au virage de l'alizarine au jaune. Pour les teintes jaunes l'acide borique est devenu défavorable. L'alizarine nous permet ainsi de fixer de façon plus précise la réaction optima du milieu; celle-ci correspondrait pour l'amylase à la teinte neutre, située entre le rose et le jaune bis, puisque, de part et d'autre, il y a décroissance de la quantité de sucre formé, soit une teinte rose très légère.

Nous allons voir qu'il en est de même pour l'émulsine.

EMULSINE. — Je me suis servi dans les expériences qui suivent d'émulsine Merck en solution 1 0/0 filtrée. Je fais agir cette solution sur de l'amygdaline en solution 4 0/0, à température ordinaire.

5 c. c. de la solution d'amygdaline + 2 c. c. sol. d'émulsine + 5 c. c. d'eau contenant en dissolution les quantités voulues d'acide borique. Le sucre est dosé sur la totalité des liquides, l'action diastasique ayant été arrêtée en même temps dans tous les tubes par un chauffage de 5' à l'ébullition.

Ac. borique en sol.	Sucre réducteur dosé, après			
	20'	1/4 h.	1/2 h.	1 h.
0	43 mgr. 7	23 mgr. 4	36 mgr. 8	61 mgr. 2
N/500	44 mgr. 2	23 mgr. 7	37 mgr. 5	58 mgr. 5
N/100	42 mgr. 2			
N/50	41 mgr. 5			
N/25		21 mgr. 8	36 mgr. 7	57 mgr. 2
N/12	39 mgr. 7			
N/8	37 mgr. 8			
N/5	34 mgr. 8	19 mgr. 7	32 mgr. 9	49 mgr. 0

Il ressort de ce tableau d'expériences que l'acide borique présente une influence défavorable qui devient nette si l'on dépasse les doses N/50. Deux questions se posent : y a-t-il une dose favorable au-dessous des doses étudiées et l'action défavorable est-elle simultanée sur la double action diastasique de l'émulsine : formation de l'amydonitril-glucoside et décomposition de ce dernier en glucose, acide cyanhydrique et benzaldéhyde. L'expérience suivante va nous renseigner à ce sujet.

25 c. c. de solution d'amygdaline à 4 0/0 + 5 c. c. de solution d'émulsine à 1 0/0 + 20 c. c. d'eau contenant en dissolution des doses croissantes d'acide borique sont mis en contact, à la température ordinaire, en matras scellés pour éviter les pertes d'HCN; après une heure et demie d'action, on arrête l'hydrolyse diastasique en portant les matras scellés au bain-marie bouillant. Le sucre est titré par la méthode Bertrand sur 5 c. c. de liquide et l'acide cyanhydrique est dosé sur les 45 c. c. restant, par la méthode cyanoargentimétrique de DENIGÈS (1) après entraînement à la vapeur d'eau.

Acide borique en solution	Millionièmes	HCN pour 50 cc.	Sucre pour 50 cc
0 soit	0	30 mgr. 3	394 mgr. 2
N/2.500	25	30 mgr. 9	402 mgr. 5
N/625	100	31 mgr. 8	419 mgr. 0
N/62	1.000	31 mgr. 2	394 mgr. 2
N/5	12.000	28 mgr. 8	351 mgr. 1
N/2	30.000	20 mgr. 7	260 mgr. 7

Cette expérience répond aux deux questions que nous nous étions posées : une action favorable est exercée par l'acide borique sur l'émulsine jusqu'à des doses de l'ordre du décigramme par litre; puis, pour des doses plus élevées, l'action défavorable apparaît nettement, et à la fois pour les deux phénomènes d'hydrolyse diastasique : la production de glucose et celle d'acide cyanhydrique restent parallèles pour les différentes doses d'acide borique.

L'action de ce dernier sur l'émulsine peut donc être représentée par une courbe dont le point maximum correspondrait à la dose de 100 millièmes, soit N/625. La descente de la courbe correspond à un changement de teinte des milieux à l'alizarine; avant le point maximum la coloration est rose, après ce point elle est jaune bis rosé, puis jaune bis. Ici encore, comme pour l'amylase pancréatique nous pouvons établir un

(1) DENIGÈS. *Annales de Chimie et de Physique*, t. VI, 7^e série, 1895.

optimum plus précis que la neutralité à l'hélianthine, qui est celle à l'alizarine.

L'action empêchante de l'acide borique sur l'émulsine aux doses élevées n'est cependant pas très considérable si on la compare à celle des acides forts, puisque le ferment peut encore agir en présence d'une solution saturée de cet acide. Voici par exemple une expérience faite avec l'acide chlorhydrique dans les conditions des premières expériences exposées ici pour l'acide borique :

	HCl en solution.	Sucre titré.
témoin	0	43 mgr. 0
	N/5.000	3 mgr. 6
	N/250	1 mgr. 7
	N/50	4 mgr. 1

L'action diastasique est pour ainsi dire arrêtée aux doses les plus faibles. Le phosphate monosodique agit à peu près avec la force de l'acide borique :

	Phosphate monosodique en solution.	Sucre titré.
témoin	0	41 mgr. 3
	N/500	41 mgr. 3
	N/25	38 mgr. 1
	N/5	39 mgr. 3

LIPODIASTASE DU RICIN. — La saponification de l'huile de ricin par la pulpe broyée des graines de cette plante est très fortement paralysée par la présence d'acide borique, et ce fait est d'autant plus curieux que cette action diastasique est particulièrement activée par une acidification assez élevée du milieu (1). L'acide borique est pour elle un empêchant énergique, même en présence des doses *optima* d'acide fort.

2 gr. 5 de pulpe de graines de ricin broyée au mortier sont mélangés avec 4 c. c. d'huile de ricin, en présence de doses d'acide borique variées, avec ou en l'absence de la dose *optima* d'acide sulfurique.

Après une heure de contact à température ordinaire, on ajoute à chaque essai 20 c. c. d'alcool à 95°; on ramène tous ceux-ci à la même acidité sulfurique et borique, et on titre l'acidité avec de la soude normale, en présence de phtaléine.

(1) CONNSTEIN, Hoyer et WARTENBERG. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. XXXV, p. 3988, 1902.

Première expérience.

	Soude employée.
2 c. c. eau	1 cc. 15
2 c. c. ac. sulf. N/10	7 cc. 90
2 c. c. eau + 60 mgr. ac. bor.	0 cc. 85
2 c. c. ac. sulf. N/10 + 60 mgr. ac. bor.	3 cc. 20

Deuxième expérience

2 c. c. eau	1 cc. 55
2 c. c. ac. sulf. N/10	5 cc. 10
2 c. c. eau + 30 mgr. ac. bor.	1 cc. 45
2 c. c. ac. sulf. N/10 + 30 mgr. ac. bor.	2 cc. 40
— — + 60 mgr. ac. bor.	2 cc. 30

Troisième expérience.

2 c. c. eau	0 cc. 70
2 c. c. ac. sulf. N/10	5 cc. 40
2 c. c. eau + 6,2 mgr. ac. bor.	0 cc. 60
2 c. c. ac. sulf. N/10 + 6,2 mgr. ac. bor.	2 cc. 90

L'action empêchante de l'acide borique est nette. Dans les trois expériences, les témoins non acidifiés par la dose favorisante d'acide fort ont produit une très faible quantité d'acides de plus que les témoins à acide borique. L'influence activante de l'acide sulfurique semble être entravée par la présence d'acide borique. La quantité d'acides gras formée par la lipodiasse en présence de la quantité optima d'acide fort est réduite environ de moitié si l'action se fait en présence d'acide borique. Cette action nuisible se manifeste pour des quantités peu élevées, puisque dans la dernière expérience j'ai employé seulement une quantité d'acide borique moléculairement équivalente à la quantité d'acide sulfurique ajoutée, c'est-à-dire 1/10 normale pour les deux centimètres cubes d'eau que l'on émulsionne avec l'huile et la pulpe de graine.

Quel est le mécanisme de cette propriété de l'acide borique? C'est ce qu'on ne saurait dire à l'heure actuelle. La lipodiasse est un ferment très sensible qui n'a pu jusqu'ici être séparé des cellules de la pulpe de graines de ricin et purifié. L'action de l'acide porte-t-elle sur le mécanisme diastasique lui-même, ou bien est-ce une rétraction quelconque du protoplasma qui se produit, empêchant le passage de la diastase. La question reste à résoudre. Dans le premier cas, ce serait la première influence

nettement nuisible de l'acide borique que nous trouvons sur les diastases depuis le début de ce travail.

DIASTASES PROTÉOLYTIQUES. — 1^o *Pepsine*. — L'acide borique ne peut, à aucune dose, même celle de 40 grammes par litre, jouer pour la pepsine le rôle de complémentaire active. En présence de la dose nécessaire d'acide chlorhydrique, l'acide borique n'augmente ni ne diminue la vitesse des digestions peptiques.

Ces deux propositions ressortent nettement des divers essais exécutés et sont en concordance avec les expériences de PETIT (1). Je me suis servi, pour cette série d'expériences, de l'essai du Codex de 1908 qui est basé sur la méthode de Petit : observation du temps nécessaire à la digestion d'une fibrine pour que le liquide de digestion ne précipite plus par l'acide azotique.

Une série de vases maintenus à 50° dans un bain-marie réglé à température constante, contenant chacun 0 gr. 10 de pepsine, 2 gr. 5 de fibrine desséchée, 10 c. c. de HCl à 10 0/0 et des doses d'acide borique variant de 0 à 40 grammes par litre, ne présentent aucune différence dans la marche de la digestion et ne donnent plus de précipité par l'acide azotique, les uns comme les autres après quatre heures de contact.

La fibrine est au contraire restée intacte après 24 heures dans des vases placés à la même température, contenant les mêmes doses d'acide borique, mais sans acide chlorhydrique.

La pepsine employée pour ces essais était une pepsine commerciale dite absolue.

2^o *Trypsine*. — Des essais faits par la méthode de Mett, en faisant agir sur des tubes de blanc d'œuf coagulé des solutions de pancréatine en présence de quantités variées d'acide borique, n'ont montré entre eux aucune différence. J'ai cherché plus de précision dans l'emploi d'une méthode récemment indiquée par SÖRENSEN (2); elle consiste en la titration directe des acides aminés formés par l'hydrolyse des matières protéiques. Ces acides ne réagissent pas à l'état libre comme des acides sur les indicateurs colorés, à cause de leur fonction amine. Si l'on arrive à bloquer cette fonction par un artifice quelconque, on pourra titrer l'acide aminé comme un acide ordinaire. A cet effet, Sørensen emploie le formol.

(1) *Loc. cit.*

(2) SÖRENSEN. Études enzymatiques. — *Comptes rendus du Laboratoire de Carlsberg*, 7^e volume, 1, 1907.

Je fais agir sur 2 grammes de fibrine séchée, mis dans 40 c. c. d'eau tenant en solution l'acide borique aux doses désirées, 10 c. c. d'une solution filtrée de pancréatine (pancréatine Macquaire répondant à l'essai du Codex 1908, 2 grammes pour 100 c. c. d'eau) à l'étuve à 40°. Au bout de temps déterminés, on prélève 10 c. c. de liquide de digestion. On les met en présence d'un mélange de 5 c. c. de formol et de 5 c. c. d'alcool à 95° additionnés de 1 c. c. d'une solution de phtaléine du phénol à 2 0/0, mélange qu'on a préalablement neutralisé.

On titre l'acidité à la soude N/10, après avoir amené les différents essais à la même concentration en acide borique, de façon à déterminer l'erreur qui provient de la difficulté de titration absolue de cet acide en présence de phtaléine. Voici les résultats d'une expérience faite dans ces conditions :

Acide borique en millièmes	Soude N/10 pour 10 cc. de liquide.	
	après 3 h.	après 6 h.
0	9 cc. 5	13 cc. 4
50	9 cc. 45	13 cc. 1
500	10 cc. 1	13 cc. 7
15.000	9 cc. 6	13 cc. 2

Aucune différence bien nette n'apparaît qui puisse indiquer l'existence d'une influence soit favorable, soit défavorable. Il paraît y avoir un optimum vers la dose de 500 millièmes. Cette dose correspond à la teinte jaune bis rosé avec l'alizarine, teinte de la neutralité. Il est à remarquer que la dose d'acide borique optimale pour la digestion de la fibrine par la trypsine est la même que la dose optimale pour la digestion de l'amidon par la pancréatine (voir plus haut).

3° *Papaïne*. — La papaïne n'est pas non plus influencée par la présence d'acide borique. Les expériences qui suivent ont été faites dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites ci-dessus pour la pancréatine. La marche de la digestion a été suivie de même par des titrations des acides aminés formés par la méthode de Sørensen.

Acide borique en millièmes	Soude N/10 pour 10 cc. de liquide.	
	après 3 h.	après 6 h.
1 ^{re} Exp. 0	5 cc. 35	6 cc. 9
50	5 cc. 25	6 cc. 75
500	5 cc. 25	6 cc. 9
2 ^e Exp. 0		9 cc. 9
40.000		9 cc. 7

Pas d'optimum visible et pas d'action empêchante, puisque

la diastase fonctionne encore en présence de 40 grammes par litre d'acide borique (1).

§ II. — DIASTASES] COAGULANTES

PRÉSURE. — En ce qui concerne la présure, j'ai repris les expériences de GERBER. Je n'ai expérimenté qu'avec la présure animale. J'ai employé comme source de présure la présure de Hansen en pastilles, mise en solution à raison d'une pastille dans 100 c. c. d'eau distillée. Le lait employé est un lait commercial pur que je centrifuge préalablement. Je dois dire tout d'abord que j'ai obtenu des résultats analogues à ceux de Gerber : l'acide borique présente, sur la coagulation du lait par la présure, une influence favorisante. Il est assez difficile de noter les temps de coagulation à 40°, bien que par comparaison il m'ait toujours été possible de constater que les tubes boriqués coagulaient avant les tubes témoins non boriqués. L'action favorisante de l'acide borique ne laisse pas de doute si on opère à température éloignée de la température optima. A température ordinaire, par exemple, les différences de temps de coagulation entre les tubes riches en acide borique et les témoins peuvent dépasser deux heures; il n'y a plus alors de doute possible à l'égard de l'influence de l'acide borique.

Je donne ci-dessous en tableau quelques-uns des résultats obtenus; le temps de coagulation est pris au moment où le tube peut être retourné.

DOSES d'acide borique en millionièmes.	TEMPS DE COAGULATION						
	5 c. c. lait + 0,2 présure.		10 c. c. lait + 0,2 présure 36°	10 c. c. lait + 0,04 présure (2)		10 c. c. lait + 0,2 présure.	
	36°	T. ord.		36°	40°	T. ord.	35°
0...	8'10"	3 h.	7'	12'45"	6'30"	58'	2'45"
125...	8'10"	3 h.	7'	10'45"	6'45"	58'	2'40"
250...	8'10"	4 h. 50'	7'	10'20"	6'13"		
500...	8'10"		7'		6'5"		
625...	8'10"	1 h. 20'	5'15"	10'30"	6'16"	48'	2'30"
1 250...	7'30"	43'	4'30"	9'15"	6'5"	17'	2'25"
2 500...	5'10"	39'		8'20"			
5 000...						3'	
30.000...							

(1) S. YOSTIMOTO a récemment signalé une action favorisante de l'acide borique sur l'autolyse des tissus, jusqu'à la concentration optima de 1 0/0. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, t. LVIII, p. 341, 1909.

(2) Occ., 4 de la solution de présure diluée dix fois.

Pour me rendre compte du mécanisme de l'action de l'acide borique sur la coagulation du lait, j'ai été amené à refaire les expériences de GERBER sur les phosphates monobasiques (1) et les citrates bibasiques (2). J'ai encore obtenu les mêmes résultats que cet auteur. Le phosphate monopotassique est un accélérateur très puissant, bien plus puissant que l'acide borique pour la coagulation du lait par la présure : du lait emprésuré (0 c. c. 2 de la solution ordinaire pour 10 c. c.) additionné de monophosphate de potasse de façon qu'il s'y trouve en solution N/20, coagule en 5 minutes à température ordinaire, alors que sans cette addition il n'est pas encore coagulé après 1 h. 1/2.

Voici une expérience comparant l'action du phosphate monopotassique à celle de l'acide borique.

5 c. c. de lait sont traités avec 0 c. c. 2 de ma solution de présure *diluée* 20 fois. L'expérience est faite à 40°.

Teneur en :	phosphate monopotassique	acide borique
témoin 0	26'45"	23'20"
N/200	20'30"	22'40"
N/100	16'15"	22'40"
N/40	10'45"	22'
N/20	8'25"	20'40"

On voit combien est grande l'action favorisante du phosphate par rapport à celle de l'acide borique.

Je retrouve pour le citrate bisodique le phénomène qu'indique Gerber : présence d'une action défavorable pour de faibles doses, puis apparition d'une action favorisante; l'expérience suivante a été faite à 39° avec la présure diluée comme dans l'expérience précédente :

Citrate monosodique
en solution.

témoin 0	coagulé en 28 minutes.
N/240	petit caillot rétracté après 2 h. 1/4.
N/120	rien après 2 h. 1/4.
N/60	
N/45	précipité grumeleux après 1/2 heure.
N/30	caillot lâche formé après 10 minutes.
N/24	
N/12	tube retournable après 4 minutes.

(1) GERBER. Action des phosphates acides de potassium et de sodium sur la coagulation du lait par les présures. *C. R. Société de Biologie*, t. LXIV, p. 141, 1908.

(2) GERBER. Action des sels de potassium et de sodium à acides organiques sur la coagulation du lait par les présures, *id.*, t. LXIV, p. 783, 1908.

Dans ces actions sur la coagulation intervient, sans qu'aucun doute puisse être possible, autre chose que des questions d'acidité. On connaît déjà un acide agissant un peu comme l'acide borique : c'est l'acide carbonique; du lait saturé de CO_2 coagule plus rapidement par la présure. Quel peut être le mode d'action de l'acide borique dans ces phénomènes? Porte-t-il sur l'action diastasique de la présure sur la caséine ou seulement sur le phénomène de la coagulation des produits formés?

Le lait non emprésuré ne coagule pas par addition d'acide borique à saturation; saturé à froid d'acide borique, il ne se coagule pas à 100° . Si on laisse en excès d'acide borique qui permette la saturation du lait pour la température de 100° , l'acide borique le coagule à cette température. Il en est de même pour le phosphate monopotassique. L'acide borique se présente déjà comme une substance ayant des propriétés coagulantes sur la caséine non transformée par la présure.

En réalité il semble bien n'intervenir dans les phénomènes de coagulation par la présure que comme adjuvant des sels de chaux. L'expérience suivante prouve qu'il n'agit pas sur la transformation diastasique de la caséine.

A température ordinaire, 5 c. c. de lait sont additionnés de 0 c. c. 2 de solution de présure dans trois tubes à essai (I, II et III). A l'un d'eux (III) on a ajouté, avant l'expérience, de l'acide borique en quantité telle qu'il se trouve dans le lait en solution N/10. On fait agir la présure sur les trois tubes pendant 5 minutes. On ajoute alors :

Au tube I 0 c. c. 5 de CaCl_2 à 10 0/0;

Au tube II 0 c. c. 5 de CaCl_2 à 10 0/0 + même quantité d'acide borique que celle mise au début de l'expérience dans III;

Au tube III 0 c. c. 5 de CaCl_2 à 10 0/0.

Les tubes II et III se prennent en masse en moins de 2 minutes.

Le tube I n'est coagulé qu'en une demi-heure.

La rapidité de coagulation des tubes à la fois boriqués et calcifiés est remarquable; elle est la même, que l'acide borique ait été présent pendant le temps d'action de la présure ou qu'il ait été ajouté en même temps que CaCl_2 , ce qui montre bien que l'acide borique n'a qu'un rôle de coagulant. Le mélange d'acide borique et de CaCl_2 est d'une extraordinaire activité. Le chlorure de calcium seul est 15 fois moins actif. L'acide borique seul est très peu actif : du lait rendu exempt de sels de chaux par addition de 1/1.000^e d'oxalate de potassium ne

coagule plus par la présure; un petit précipité caillebotteux apparaît cependant au bout de quelque temps, sous l'influence de fortes doses d'acide borique. Quelle est la nature du coagulum formé dans ce dernier cas? C'est une question que de nouvelles expériences me permettront sans doute d'élucider.

En résumé, l'action de l'acide borique apparaît comme celle d'un coagulant : nous allons retrouver dans l'étude de son action sur la pectase un semblable rôle d'adjuvant des sels de chaux.

PECTASE. — La pectine qui a servi à mes expériences est préparée d'après la méthode qu'ont indiquée MM. G. BERTRAND et MALLÈVRE (1) dans leur travail sur la fermentation pectique. La solution à 2 0/0 est neutralisée bien exactement, précaution très importante.

La pectase a été préparée partant du trèfle. On broie et on presse des feuilles de trèfle. Le liquide est abandonné pendant 24 heures en présence d'un peu de chloroforme. On filtre. On précipite par trois volumes d'alcool à 96°. On centrifuge le précipité obtenu et on le reprend par l'eau. La partie soluble est reprécipitée par trois volumes d'alcool, centrifugée et rapidement séchée dans le vide. Le produit obtenu est mis en solution à raison de 0 gr. 5 0/0 dans nos expériences. Cette solution était additionnée de quelques gouttes de CaCl_2 N/10.

Dans toutes nos expériences, les concentrations en acide borique varient de N/80 à N/2. Il est très difficile de faire une détermination exacte du temps de coagulation, mais, par comparaison, j'ai toujours pu observer que les tubes additionnés d'acide borique coagulaient avant les tubes témoins, sauf cependant pour les doses élevées, voisines de la saturation. Voici par exemple des temps expérimentaux obtenus :

1 c. c. de pectine + 1/2 c. c. sol. de pectase + 1/2 c. c. H_2O tenant l'acide borique en solution.

Acide borique en solution	Temps de coagulation
0	1 h. 10'
N/80	40'
N/40	45'
N/20	1 h.
N/8	1 h.
N/2	1 h. 10'

(1) BERTRAND et MALLÈVRE. Recherches sur la pectase et la fermentation pectique. — *Bull. Soc. Chim.*, t. XIII, pp. 77 et 252, 1895.

Le temps de coagulation est pris au moment où l'on peut retourner le tube. Il paraît y avoir un maximum pour des doses peu élevées, chose que nous n'avions point vue pour la coagulation du lait. Nous observons cependant encore ici une influence coagulante de l'acide borique, influence qui semble compléter celle des sels de calcium sans lesquels la pectase ne peut donner de coagulation.

Avec le phosphate monopotassique nous n'obtenons pas les mêmes résultats que dans le cas du lait et de la présure. Ici c'est une influence empêchante très nette qui nous apparaît; le phosphate monopotassique, sans être un corps d'acidité aussi forte que HCl ou l'acide malique, dont MM. G. Bertrand et Mallèvre ont signalé l'action empêchante sur la fermentation pectique, se rapproche alors de ces acides et non de l'acide borique comme on aurait été tenté de le croire.

I ^o Témoin	retournable après 1 h. 14.
PO ⁴ H ³ K { N/40 }	liquides après 4 heures.
{ N/20 }	
Acide borique N/8.....	retournable après 1 heure.

Temps de coagulation

II ^o Témoin	55'
PO ⁴ H ³ K { N/800	1 h. 1/2
{ N/400	1 h. 1/2
{ N/200	3 heures.
{ N/80	Non retournable après 3 h. 1/2.

Le citrate disodique paraît encore plus empêchant et ne donne pas le phénomène, observé avec la caséine, d'une dose empêchante suivie d'une dose favorisante :

		Temps de coagulation	
Témoin	1 h.	
Citrate disodique en solution	{ N/800	3 h.	
		N/400	3 h.
		N/200.....	6 h.
		N/80	7 h.

Ainsi, seul de ces trois corps, l'acide borique présente une influence analogue sur la coagulation pectique et la coagulation du lait par la présure. Nous retrouverons, à propos de la tyrosinase, l'action coagulante de l'acide borique, qui nous appa-

raîtra alors comme un phénomène général sur la coagulation, d'ordre probablement physique.

§ III. — DIASTASES OXYDANTES

LACCASE. — J'ai laissé de côté l'étude de l'action de l'acide borique sur la laccase. Son inactivité a été signalée dans le travail de G. BERTRAND (1).

TYROSINASE. — Je me suis adressé pour ce travail aux deux bonnes sources de tyrosinase connues : l'extrait de son de froment (2) et la macération glycinée de Russule (*Russula queleti* Fr.).

J'ai opéré en milieu aseptique avec l'extrait de son. Une solution de tyrosine stérilisée à l'autoclave, avec des doses d'acide borique déterminées, est additionnée d'extrait de son (macération aqueuse) filtré à la bougie Chamberland.

Acide borique en millionèmes	Coloration		
	après 18 h.	après 24 h.	après 40 h.
0	noircissement net	noir	noir
155	»	noir	noir
625	liquide brunâtre	marron	brun
2.500	»	»	»
7.500	»	»	»

C'est une influence nettement défavorable qui nous apparaît. Nous retrouvons le même phénomène encore plus accentué avec le phosphate monosodique. A doses moléculairement équivalentes, il est plus empêchant que l'acide borique sur l'action de la tyrosinase du son.

Dans les deux cas, pour les fortes doses, un louche apparaît dans la liqueur; ce louche doit être dû à une précipitation des sels de chaux qui sont en notable quantité dans l'extrait de son, et nous savons que la présence de ces sels est nécessaire à l'apparition des mélanines dans les liquides d'oxydation tyrosinase (3). La tyrosinase du son est, pour notre étude, un matériel défavorable et nous pourrions mieux élucider la question en nous adressant à une tyrosinase très peu riche en sels de chaux :

(1) *Loc. cit.*

(2) G. BERTRAND et W. MUTERMILCH. Recherches sur le mode de coloration du pain bis. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 833, 1907.

(3) Voir G. BERTRAND. Recherches sur la mélanogénèse. *Bulletin des Sc. pharmacologiques*, t. XV, p. 65, 1908.

l'extrait glycéринé de Russule sera, à ce point de vue, la préparation de choix. S'il n'est pas additionné d'une petite quantité d'un sel de chaux, il ne précipite pas les mélanines dans les solutions de tyrosine ou seulement en très faible quantité : le liquide garde une teinte marron rouge, même si l'on pousse très loin l'oxydation. L'addition d'une trace d'oxalate d'ammoniaque empêche l'apparition de toute teinte foncée; le liquide oxalaté rosit presque instantanément, plus rapidement même que les liquides non oxalatés, mais il garde perpétuellement la teinte rouge et sa transparence (1).

L'addition de sels de chaux en quantité appréciable empêche au contraire tout rosissement du liquide, au fur et à mesure de l'oxydation, la substance est coagulée sous forme de mélanine et précipite en donnant au début une teinte gris-violet au liquide, puis un dépôt noir apparaît rapidement sur le fond du tube.

Il était nécessaire, pour comprendre le mode d'action de l'acide borique que nous allons exposer, de préciser ces quelques points et de bien établir les deux temps de la réaction : oxydation de la tyrosine qui est le phénomène diastasique; précipitation des produits d'oxydation sous forme de mélanine, due à la présence de sels de chaux et absolument indépendante de la présence de la diastase : on peut en effet, dans les tubes oxalatés, produire un précipité mélanique après destruction de la diastase par la chaleur en ajoutant un excès de sels de chaux. Nous établirons d'ailleurs sur cette possibilité de précipitation des mélanines, après destruction de la diastase, une méthode de dosage de celles-ci. Il y a dans l'action des sels de chaux sur la coagulation des mélanines, analogie complète avec leur action sur la coagulation des produits de transformation de la caséine sous l'influence de la présure. Le sel de chaux, qu'il entre ou non en combinaison avec le produit d'oxydation, n'intervient dans le phénomène que comme agent de coagulation. Nous allons trouver une semblable analogie entre l'action de l'acide borique sur les oxydations tyrosinasiques et son action sur la coagulation du lait que nous avons déjà vue.

Voici deux des nombreuses expériences qualitatives faites sur l'action de l'acide borique sur la tyrosinase.

(1) Voir à ce sujet : GESSARD. Études sur la tyrosinase; *Ann. Inst. Pasteur*, t. XV, p. 593, 1901.

5 c. c. de solution saturée de tyrosine son additionnées de 2 gouttes d'un extrait glyciné de *Russula queleti* et de doses croissantes d'acide borique :

ACIDE BORIQUE en millionièmes.		COLORATION APRÈS			
		3/4 heure.	2 heures.	3 heures.	18 heures.
0		Roses.			Rouge brun
250	Rosissement. immédiat.	La teinte rose diminue en allant vers 5.000.	Même observat. plus accentuée.	Roses.	Brun de moins en moins rouge en allant vers 5.000.
500					
1.250					
2.500					
5.000	Retard.			Brun rosé.	

2 c. c. solution de tyrosine saturée + 1/10^e c. c. extrait de *Russula* :

ACIDE BORIQUE en millionièmes.		COLORATION APRÈS	
		2 heures.	18 heures.
0	Rosissement.	Rouges vif.	Rouge-brun.
1.000	Immédiat.		Brun.
30.000	Retard.	Rouge-brun.	Brun-noir.
Q. s. pour sa- turer	Aucune teinte après 5'.	Brun jaunâtre. (léger ppté brun).	Liquide brunâtre où flottent des particules noires visibles.

En résumé, nous voyons diminuer la teinte rouge au fur et à mesure qu'augmente la concentration en acide borique. Dès l'abord on serait tenté de croire à une influence empêchante si l'on n'était prévenu que la coloration rouge n'indique rien de précis, puisqu'elle n'apparaît même plus lorsqu'on force les doses de sels de chaux, ainsi que je l'ai dit plus haut. Le brunissement, qui est un commencement de précipitation des mélanines, apparaît très rapidement dans les tubes riches en acide borique; un dépôt se forme même au fond du tube. Nous sommes alors tentés de rapprocher l'action de l'acide borique sur la tyrosinase de son action sur la présure et la pectase comme je le faisais prévoir tout à l'heure. L'acide borique agirait comme coagulant des mélanines, avec, comme pour ses autres actions coagulantes, une puissance bien moins grande que les sels de chaux. La démonstration que l'acide borique n'a pas d'action empêchante

sur la tyrosinase et que par conséquent les modifications de teinte des liquides d'oxydation dues à sa présence ne proviennent que d'un état différent de coagulation du produit oxydé nous sera fournie par un dosage de ce produit.

Dans trois matras contenant chacun 0 gr. 5 de tyrosine dissoute dans un litre d'eau on ajoute des doses d'acide borique.

I	0 gr.
II	5 gr.
III	30 gr.

On additionne ensuite le liquide de chacun des matras de 50 c. c. de macération glycinée de Russule. On fait barboter dans les matras, bouchés au caoutchouc et réunis par des tubes coudés, un faible courant d'air pendant 20 heures à la température du laboratoire. Après une demi-heure, les matras II et III ont bruni et ont perdu leur transparence; le I est encore transparent et d'un beau rouge acajou. Au bout des 20 heures on bouche les matras à l'ouate et on porte un quart d'heure à 110° en autoclave pour tuer la diastase et aussi stériliser les liquides dont la filtration sera longue et que les microorganismes pourraient envahir pendant ce temps. Après refroidissement on ajoute à chaque matras 10 c. c. d'une solution de chlorure de calcium à 10 0/0 stérilisée et on laisse déposer 24 heures. Dans ces conditions la presque totalité des mélanines est précipitée; la très faible quantité qui colore légèrement le liquide surnageant est impondérable. On filtre alors sur petits filtres tarés (T), on vérifie que le liquide filtré ne donne pas de précipité mélanique par addition de CaCl_2 . Les filtres et leur contenu sont séchés à poids constant dans une étuve à 110° et on pèse (A). On calcine alors le tout avec précaution et les cendres obtenues sont pesées (B). Le poids de matière organique oxydée = $A - (B + T)$. On a éliminé de la sorte l'erreur possible due à la précipitation des sels de chaux par l'acide borique et aux matières minérales entraînées par les mélanines. Dans ces conditions nous avons obtenu les résultats suivants :

Acide borique	Poids de matière organique oxydée
I 0	0 gr. 3465
II 5.000	0 gr. 3524
III 30.000	0 gr. 3532

Ces chiffres permettent d'affirmer que l'acide borique n'agit pas comme empêchant de la tyrosinase. Le phénomène qualitatif observé n'est dû qu'à l'action coagulante de l'acide borique sur les mélanines. Même en présence d'oxalate d'ammoniaque, les liquides d'oxydation tyrosinasiques qui ont été additionnés d'acide borique brunissent. La précipitation n'est pas complète comme avec les sels de chaux. Nous avons vu de même la for-

mation d'un caillot lâche sous l'action de la présure dans les laits oxalatés additionnés d'acide borique (1).

Au groupe des diastases oxydantes, c'est-à-dire fixant l'oxygène de l'air directement, je joins celui des peroxydiastases et de la catalase pour la commodité de l'exposé.

PEROXYDIASTASES. — L'acide borique à toute dose est inactif vis-à-vis des peroxydiastases agissant, en présence d'eau oxygénée, comme oxydants du gaïacol et de la teinture de gaïac. M. G. BERTRAND et M^{lle} ROZENBAND ont d'ailleurs signalé le fait dans une récente étude sur l'action des acides sur les peroxydiastases (2).

CATALASE. — La décomposition de l'eau oxygénée par la catalase est légèrement influencée par la présence d'acide borique, surtout aux fortes concentrations. Je me suis servi d'une solution aqueuse provenant du lavage au mortier dans 40 c. c. d'eau, de 25 grammes de panne de porc fraîche, très riche en catalase. Après un quart d'heure d'action sur une solution à 5 0/0 de perhydrol de Merck, j'arrête l'action diastasique par addition d'acide sulfurique et je titre l'eau oxygénée non décomposée par le permanganate N/10.

	Permanganate N/10 employé
Témoin avec diastase bouillie	12 cc. 8
0 acide borique	5 cc. 6
50 millionièmes acide borique	5 cc. 8
500 — — — — —	5 cc. 8
6.000 — — — — —	6 cc. 1
11.000 — — — — —	6 cc. 2
24.000 — — — — —	9 cc. 9

Une autre expérience m'a montré qu'en présence de 30 grammes par litre d'acide borique, il y a encore une décomposition de l'eau oxygénée. Néanmoins, la vitesse de l'action se trouve entravée notablement à partir de 6 grammes par litre, ainsi que l'indique le tableau précédent.

(1) On trouvera dans une note récente une modification de cette méthode de dosage, destinée à la rendre plus rapide, ainsi que des données sur la réaction la plus favorable du milieu à la formation des mélanines; voir H. AGULHON: Influence de la réaction du milieu sur la formation des mélanines par oxydation diastasique. *C. R. Acad. Sciences*, t. CL., p. 1066, 1910.

(2) *Loc. cit.*

CONCLUSIONS

Résumons en peu de mots les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sur l'influence de l'acide borique sur les actions diastasiques.

Les diatases hydrolysantes des hydrates de carbone et des glucosides, ainsi que celles des matières protéiques, fonctionnent encore en présence d'acide borique à saturation à froid; c'est dire que son action empêchante est bien faible. Nous avons pu établir une courbe de l'action de l'acide borique sur un certain nombre d'entre elles : sucrase, amylase pancréatique, émulsine, trypsine; courbe qui nous a permis de ramener la réaction optima du milieu pour les trois dernières actions diastasiques à la neutralité à l'alizarine, neutralité plus sensible et correspondant mieux à l'exactitude des faits que la neutralité à l'hélianthine envisagée jusqu'ici. L'acide borique est inactif sur les oxydases et les peroxydiastases. Il gêne l'action de la catalase au fur et à mesure que sa dose croît, sans arriver cependant à l'entraver entièrement.

Par un mécanisme inexpliqué, probablement un phénomène d'ordre physique, du genre de ceux que DUCLAUX classe sous le nom de phénomènes d'« adhésion moléculaire » (1) et par lesquels il explique les phénomènes de coagulation, l'acide borique intervient de façon favorable sur ces derniers. Nous l'avons pu constater dans les trois cas étudiés, assez dissemblables les uns des autres : la coagulation du lait, celle de l'acide pectique et enfin celle des mélanines. Mais il me semble que, dans ces derniers cas, nous sommes en dehors des phénomènes diastasiques étudiés en eux-mêmes; l'intervention a lieu sur le phénomène annexe qu'est la coagulation des produits formés. On peut donc dire qu'en dehors de la lipodiasse, où l'on n'est d'ailleurs pas sûr qu'il agisse directement sur la propriété diastatique, l'acide borique est un corps remarquablement inactif à la fois dans le sens favorable et le sens défavorable sur les actions des ferments solubles. La faiblesse de son action antiseptique est évidemment en relation avec cette inactivité.

(1) DUCLAUX. *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 263,

Etude de l'infection du cobaye par le microbe de Preisz-Nocard

PAR L. PANISSET

Professeur à l'Ecole vétérinaire de Lyon.

On identifie sous le nom de bacille de Preisz-Nocard ou de bacille de la suppuration caséuse un microbe capable de provoquer, chez diverses espèces animales, des infections extrêmement différentes. L'*acné contagieuse du cheval*, de Dieckerhoff et Grawitz, la *pseudo-tuberculose du mouton*, de Preisz et Sivori et la *lymphangite ulcéreuse du cheval*, de Nocard, sont dues au bacille de la suppuration caséuse. Un grand nombre d'observations rapportées par Nocard et Leclainche montrent que le bacille de Preisz-Nocard est capable de déterminer les accidents les plus variés.

L'attention a été attirée récemment sur une propriété qui n'avait que peu retenu jusqu'alors l'attention des expérimentateurs. Simultanément, Dassonville et surtout Carré montrent que le microbe de Preisz-Nocard, comme le bacille de la diphtérie, avec lequel il a des analogies morphologiques, est capable d'élaborer une véritable toxine. Cette constatation est pour Carré l'origine d'une série d'études sur une maladie particulière du mouton : *les eaux-rousses*, dans laquelle l'agent microbien dont nous nous occupons ne semble intervenir que comme agent toxigène. Nous n'envisagerons point, dans cette étude, cette face de la question, nous nous sommes borné dans nos recherches à envisager le bacille de Preisz-Nocard comme agent d'infection et non comme agent d'intoxication, il nous a suffi pour cela d'inoculer exclusivement des corps microbiens prélevés sur milieux solides.

Nous résumerons, avant de pénétrer plus avant dans notre sujet, les données incertaines ou contradictoires publiées sur la virulence, pour le cobaye, du microbe de la suppuration caséuse.

Dieckernoff et Grawitz (1) rapportent que le cobaye est tué en 48 heures, après simple dépôt d'une culture pure sur la peau desquamée et en 24 heures après injection sous-cutanée.

Nocard (2) constate que l'inoculation sous-cutanée aboutit en 4 à 5 jours, à la formation d'un abcès volumineux, la cicatrisation de la cavité abcédée est longue; d'autres abcès évoluent dans le voisinage, l'animal succombe rarement. C'est à propos de ce microbe que Nocard signale, pour la première fois, qu'il est possible d'obtenir une orchite qui simule l'orchite morveuse. Nocard donne une excellente description de cette vaginalite, consécutive à l'inoculation péritonéale et signale la possibilité de tuer les animaux rapidement par intoxication, avant que les altérations génitales aient évolué.

Nørgaard et Mohler (3) ont apporté des résultats plus complets sur la virulence d'un bacille qu'ils avaient isolé de l'adénite caséuse du mouton. Le microbe avec lequel les auteurs américains ont expérimenté, tue le cobaye inoculé sous la peau ou dans les muscles en 15 à 18 jours, l'inoculation d'une grosse dose détermine une infection généralisée.

L'ingestion tue en 4 à 8 semaines; les ganglions de la tête et du cou sont envahis ainsi que les organes abdominaux, tandis que le poumon reste indemne. L'inoculation péritonéale ($1/3$ à $3/4$ de c. c. de culture) tue en 8 à 15 jours; il existe, au point d'inoculation, une lésion avec centre caséux; on trouve des nodules caséux dans le foie, dans la rate et le long des lymphatiques du mésentère. L'inoculation intra-veineuse (3 à 6 gouttes de culture) tue le cobaye en 4 à 10 jours, avec des lésions généralisées.

Nous n'avons retenu dans ce résumé que les travaux les plus importants sur le bacille de la suppuration caséuse, ces quelques données suffisent à montrer, en dehors des différences liées à l'origine des microbes, combien les indications fournies sont discordantes.

Nous serons bref sur les données techniques concernant la culture et le dosage du virus, nous nous sommes inspiré de la

(1) DIECKERHOFF et GRAWITZ. *Die Acne contagiosa des Pferdes und ihre Aetiologie*. Arch. f. path. Anatomie. T. CII, 1885, p. 148.

(2) NOCARD. Sur une lymphangite ulcéreuse simulant le farcin morveux chez le cheval. *Annales Inst. Pasteur*. T. X, 1896, p. 69.

(3) NØRGAARD et MOHLER. *The nature, cause and economic importance of ovine caseous lymphadenitis*. 16 th. annual report of the Bureau of animal industry, 1899, p. 638.

méthode utilisée par M. Nicolle dans son étude de la morve expérimentale du cobaye.

La culture qui nous a servi provenait d'un abcès du rein, trouvé incidemment à l'autopsie d'un cheval qui avait présenté, sans doute antérieurement, de la lymphangite ulcéreuse, l'extension du processus aux ganglions prépelviens et aux reins étant assez fréquente.

Nous n'avons utilisé pour nos recherches que des cultures sur milieu solide, nous avons employé dans ce but de la gélose débarrassée de son eau de condensation. La gélose ascite convient particulièrement bien, on obtient assez rapidement une récolte abondante de corps bacillaires; la gélose-peptone ordinaire et surtout la gélose à la pomme de terre, si favorable à la culture du bacille morveux, ne conviennent pas très bien au microbe de Preisz-Nocard. Les tubesensemencés largement étaient maintenus 24 heures à l'étuve et la récolte effectuée seulement 24 heures plus tard, après séjour à la température du laboratoire.

Nous avons dosé exactement les microbes destinés à être inoculés, en suivant la technique indiquée par M. Nicolle (*Loc. cit.*, page 629). Nous rappellerons seulement que l'unité choisie est le centigramme et que nous représenterons les doses de 1/10 de centigramme, 1/100 de cgr, 1/1000 de cgr., de la façon suivante : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ...

INOCULATION DANS LE PÉRITOINE DU COBAYE MÂLE

Le bacille de Preisz-Nocard, inoculé dans le péritoine du cobaye mâle, détermine des lésions de vaginalite tout à fait semblables à celles provoquées par l'inoculation du bacille morveux. Nous ne reviendrons pas ici sur la disposition de l'appareil génital du cobaye, renvoyant pour l'étude de ces particularités à l'article *Cobaye* de Livon dans le *Dictionnaire de Physiologie* et à la description si précise qui en a été fournie par M. Nicolle.

La dose limite active et de 10^{-9} , qui détermine encore une lésion locale, il faut pourtant au moins 10^{-7} pour obtenir des lésions génitales, ces résultats n'ont été certains qu'avec 10^{-5} . Dans une série d'expériences, la dose limite capable de provoquer des lésions génitales, a été de 10^{-3} , le microbe avait perdu de sa virulence par quelques tentatives pour l'acclimater à végéter sur de la gélose à la pomme de terre.

LÉSIONS GÉNITALES DU COBAYE MALE

Lorsque les lésions génitales existent, elles sont à peu près identiques, quelle que soit la dose inoculée.

La maladie évolue très généralement sous la forme subaiguë. Dès le 2^e jour après l'inoculation, on note une lésion locale au point de pénétration de l'aiguille. Au début, c'est un petit nodule variant du volume d'une tête d'épingle à celui d'une noisette et évoluant vers la suppuration. Il est à peu près constant. Dans la morve, cette localisation n'existe pas chez le cobaye mâle, elle n'apparaît qu'à la suite de l'inoculation intrapéritonéale chez la femelle.

Deux ou trois jours après l'inoculation, on peut percevoir de l'œdème de la peau des bourses et de la racine de la verge. Bientôt il devient difficile de faire rentrer dans la cavité abdominale les testicules qui sont en permanence dans le scrotum. Les testicules pris se fixent rapidement dans le scrotum et, le plus souvent, ils ne sont atteints que l'un après l'autre. Lorsque les testicules sont fixés, les bourses se tuméfient et peuvent atteindre le volume d'une noix ; on ne note jamais la tuméfaction quelquefois considérable et les signes inflammatoires de l'orchite morveuse. Le scrotum, d'abord dur, devient mou et fluctuant. L'ouverture se fait en un point où la peau est devenue livide et noirâtre. L'orifice ainsi créé donne issue à un pus crémeux, blanc jaunâtre. Cette suppuration peut se tarir et la petite ouverture se cicatriser. Les animaux peuvent succomber avant ou après l'ouverture des collections purulentes génitales.

En sacrifiant des animaux aux divers stades de la maladie et en procédant à l'autopsie de ceux qui viennent à succomber, il est possible d'assister à l'évolution des lésions. Comme pour la morve, le virus se localise tout d'abord sur la séreuse qui revêt le *musculus testis*. Ces lésions débutent sur la face interne de la face péritonéale du *musculus testis* par de petits exsudats blanc grisâtre, peu consistants, du volume d'une tête d'épingle, les uns isolés, le plus grand nombre confluents. Ces petites granulations ne sont pas entourées d'une zone congestive : l'absence des phénomènes inflammatoires différencie les lésions dues au microbe de Preisz-Nocard de celles déterminées par le bacille morveux.

Ultérieurement, de nouveaux exsudats apparaissent sur le

musculus testis et sur le testicule. Sous les exsudats épais, confluents, on trouve la séreuse dépolie et grisâtre, les testicules sont sains. La réaction inflammatoire fait à peu près complètement défaut. Peu à peu, le muscle testiculaire se trouve détruit; les deux séreuses sont confondues, leurs parois sont épaissies, tomenteuses, recouvertes d'exsudats consistants, recouverts eux-mêmes d'un pus crémeux. La cavité des bourses se remplit peu à peu d'un pus caséeux, quelquefois roussâtre.

Le testicule exempt de lésions est atrophié par l'exsudat. La glande génitale refoulée en avant et dehors s'aplatit, se réduit à une mince lamelle de tissu mou et grisâtre. Lorsque la collection atteint un volume plus considérable, le petit nodule testiculaire repoussé de bas en haut, confondu avec les parois de l'abcès, disparaît, sans avoir jamais présenté de lésions. On ne note jamais en particulier cet épaississement fibro-lardacé de l'albuminée, qui fait rarement défaut dans la morve péritonéale.

Les corps adipeux sont transformés en une gelée transparente de couleur rougeâtre.

En dehors des ulcérations génitales, on peut trouver quelquefois des exsudats de même nature dans le petit bassin.

La *forme ectopique*, dont Nicolle a signalé l'existence dans la morve du cobaye mâle, est rarement provoquée par l'inoculation intrapéritonéale du bacille de Preisz-Nocard. Pourtant, nous l'avons observée une fois chez un cobaye qui avait reçu 10^{-1} . La maladie est caractérisée essentiellement par la persistance du testicule dans l'abdomen. A la palpation on perçoit, au niveau de l'anneau inguinal, un petit nodule dur, plus ou moins régulièrement arrondi, qui correspond au *musculus testis*. L'animal étant mort rapidement (3 j. 1/2), nous n'avons pu suivre les stades ultérieurs du processus.

INOCULATION DES DOSES SUPÉRIEURES A 10^{-3}

Nous avons dit qu'il avait été nécessaire de remonter jusqu'à la dose 10^{-3} pour obtenir l'infection du cobaye, mais c'est là une exception. Les doses 10^{-5} et même 10^{-6} conviennent parfaitement.

Les doses plus élevées que 10^{-3} , c'est-à-dire 10^{-2} , 10^{-1} , un demi-centigramme et même 1 centigramme ont encore été capables de

déterminer une infection suffisamment ralentie pour qu'il soit possible de voir évoluer les lésions génitales. Pourtant, il nous faut dire que les essais avec 1 centigramme et un demi-centigramme ont été faits longtemps après les expériences d'ensemble et que le microbe semblait avoir beaucoup perdu de sa virulence pendant la conservation exclusive *in vitro*.

Quelle que soit la dose inoculée, l'inoculation suivie d'infection entraîne la mort dans un délai variable ; pourtant cette terminaison est loin d'être absolue. Avec les doses pour lesquelles nous avons fait un nombre assez considérable d'inoculations, on peut donner les chiffres suivants :

10^{-1}	mort en	3 jours 1/2
10^{-2}	—	6 jours
10^{-3}	—	5 jours 1/2
10^{-4}	—	10 jours
10^{-5}	—	11 jours 1/2
10^{-6}	—	12 jours

INOCULATION SOUS LA PEAU

Des doses variant entre 10^{-5} et 10^{-9} déterminent l'apparition d'un abcès avec retentissement ganglionnaire plus ou moins accusé, généralement assez marqué. L'abcès, dont le volume varie de celui d'un pois à celui d'une noisette, présente des alternatives d'ouverture et de fermeture, généralement à deux reprises. La guérison survient après quelques semaines (5 à 6 semaines). L'émaciation n'est que transitoire, peu marquée, elle peut faire totalement défaut.

INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES CHEZ LE COBAYE FEMELLE ADULTE

Comme pour l'étude de la morve et de toutes les infections en général, il convient, surtout pour les inoculations dans le péritoine, d'éliminer les femelles pleines.

Les doses de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , n'ont jamais produit d'accidents. 10^{-3} a déterminé un nodule local insignifiant et éphémère.

Avec 10^{-1} et 10^{-2} , il se développe un abcès superficiel qui évolue de la même façon que les abcès déterminés par l'inoculation sous-cutanée, présentant des alternatives d'ouverture et

de fermeture. Il se fait dans le péritoine un nodule adhérent à la paroi et relié par une corde à l'abcès superficiel. Quelquefois, on assiste au développement, dans la cavité du péritoine, d'une masse mamelonnée qui peut atteindre le volume d'un œuf.

Comme pour la morve, il existe une différence entre la sensibilité des cobayes mâles et des cobayes femelles. Pour apprécier cette différence, nous avons inoculé parallèlement à ces animaux des deux sexes la même dose de la même dilution.

On inocule en même temps deux cobayes femelles et deux cobayes mâles avec 10^{-1} dans le péritoine. Les deux femelles présentent des nodules, l'une succombe 38 jours $1/2$ après l'inoculation d'une infection intercurrente (pseudo-pneumocoque), l'autre résiste. Les deux mâles succombent en 3 jours et 3 jours $1/2$ avec des lésions typiques. Avec 10^{-2} et 10^{-3} , toutes les femelles résistent et les mâles succombent pour la plupart, quelques-uns survivent à de graves lésions génitales.

Si la différence existe entre la sensibilité des mâles et des femelles à l'inoculation péritonéale, cette différence est moins marquée que dans la morve, en raison de la moindre gravité de l'infection à bacille de Preisz-Nocard chez le cobaye mâle. Les raisons de la vulnérabilité moins grande du péritoine de la femelle ont été recherchées par Nicolle à propos des bacilles morveux, il y aurait peu à ajouter aux explications qu'il a fournies à ce sujet, et on pourrait répéter avec le bacille de Preisz-Nocard les expériences réalisées avec le bacille de la morve.

INFECTION DES JEUNES COBAYES PAR LA VOIE PÉRITONÉALE

Nous avons inoculé un certain nombre de cobayes mâles pesant en moyenne 150 grammes.

10^{-6} n'a provoqué qu'un nodule au point d'infection, sans manifestation dans la zone génitale. La mort est survenue après 14 jours. 10^{-4} détermine l'apparition d'un petit abcès sous-cutané et sous-péritonéal au point d'inoculation. Les lésions génitales se traduisent par l'atrophie des testicules déterminée par le pus qui remplit le scrotum, les deux séreuses sont confondues. La maladie dure plus longtemps que chez les adultes (22 jours).

INOCULATIONS INTRACARDIAQUES

Toutes nos expériences ont été faites chez des cobayes adultes

mâles et chez quelques femelles. Avec la dose 10^{-4} on n'observe qu'une émaciation légère et transitoire.

Les doses 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} déterminent des accidents analogues, mortels à plus ou moins brève échéance. Avec 10^{-1} la mort est survenue en 5 jours $1/2$, avec 10^{-2} en 13 jours $1/2$, avec 10^{-3} en 19 jours.

Il survient, dès le lendemain de l'inoculation, une éruption d'abord discrète, puis confluyente de pustules, dont les dimensions varient de celles d'une tête d'épingle à celles d'une petite lentille. L'éruption apparaît tout d'abord dans la région du thorax dépillée pour pratiquer l'inoculation, on observe généralement au niveau du point de pénétration de l'aiguille une pustule plus volumineuse. Les jours qui suivent, des pustules apparaissent au niveau des aines, sur le fourreau, le scrotum; quelquefois sur le bout du nez, les paupières, sur les parties inférieures des membres. Les pustules s'ouvrent, se dessèchent et après quelques jours il se fait une nouvelle poussée éruptive dans les mêmes régions.

En même temps que se font les poussées éruptives, on voit se manifester des ostéo-périostites débutant par de la tuméfaction inflammatoire et aboutissant généralement à la suppuration. Les abcès qui se forment à ce niveau sont quelquefois sous-cutanés, le plus souvent lorsque la collection purulente est ouverte on peut s'assurer que l'os est compris dans le foyer suppurant. Ces ostéo-périostites sont surtout fréquentes au voisinage ou au niveau des articulations radio-métacarpiennes, tibio-tarsiennes ou inter-métacarpiennes ou inter-phalangiennes. On les observe également au niveau des cornets inférieurs, des os de la face (sus-nasaux) ou encore au niveau des apophyses épineuses des vertèbres dorsales ou assez fréquemment des ischions. Les abcès des ischions peuvent atteindre un volume considérable (petite pomme). Dans la zone génitale, l'examen clinique permet de constater, dans quelques cas, l'apparition d'une éruption sur l'un ou l'autre des testicules ou sur les deux à la fois; à travers le scrotum, la palpation décèle un sablé de la surface du testicule; on peut noter également de l'épaississement du muscle testiculaire. Les pustules, les ostéo-périostites et les lésions génitales évoluent simultanément.

A l'autopsie, les testicules ou seulement l'un d'entre eux sont

augmentés de volume, transformés en un sac purulent coiffé de l'épididyme, le parenchyme testiculaire a complètement disparu. Lorsqu'un testicule seul est atteint, on note toujours une atrophie très manifeste de l'autre glande génitale, il peut exister sur l'albuginée et sur le muscle testiculaire une éruption discrète de très petites pustules des dimensions d'une fine tête d'épingle. On trouve quelquefois, au niveau de l'insertion du muscle testiculaire sur le testicule, un nodule purulent du volume d'un pois. La dissection des foyers d'ostéo-périostite permet de reconnaître la nature exacte des altérations : l'os pousse dans le périoste enflammé, hypertrophié des aiguilles osseuses, cette couche fibro-lardaire plus ou moins épaisse, creusée ou non de trajets purulents, est recouverte par un œdème sous-cutané toujours assez abondant. L'autopsie permet souvent de mettre en évidence de petits abcès (des ischions ou d'origine costo-rachidienne) qui échappent aux investigations cliniques.

Comme nous l'avons dit en commençant, le bacille de Preisz-Nocard peut être considéré comme un agent infectieux, analogue au bacille morveux et comme un agent toxique analogue au bacille diphtérique. Dans cette étude, nous nous sommes attaché surtout à comparer le bacille de Preisz-Nocard au bacille de la morve.

Dans l'ensemble, on peut dire que si ces deux microbes sont capables de provoquer des phénomènes analogues, notamment la vaginalite, les manifestations de la morve sont plus graves, plus bruyantes, évoluent plus rapidement, avec des lésions congestives et inflammatoires beaucoup plus accusées que celles déterminées par le bacille de Preisz-Nocard.

A notre connaissance, l'éruption pustuleuse consécutive à l'inoculation intracardiaque, chez le cobaye, du microbe de la suppuration caséuse n'avait pas encore été signalée. Cette constatation nouvelle permet de comprendre mieux encore la multiplicité des caractères pathogènes du bacille de Preisz-Nocard, elle nous paraît également de nature à contribuer à l'établissement d'une notion définitive, sur la pathogénie encore obscure des lésions cutanées dans les maladies infectieuses.

Le Gérant : G. MASSON.
